

09/857651

PCT/JP99/06881

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

21.01.00

REC'D 10 MAR 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年12月 9日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第350584号

出 願 人

Applicant (s):

関 達治  
藤山 和仁

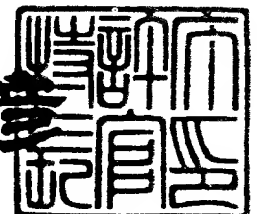
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3009489

【書類名】 特許願

【整理番号】 J198020401

【提出日】 平成10年12月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01H 1/00  
A01H 3/00

【発明の名称】 ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府吹田市山田西2-4 A1-505

    【氏名】 吉田 敏臣

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府箕面市箕面5-13-53-209

    【氏名】 関 達治

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府吹田市山田西1-28 A18-308

    【氏名】 藤山 和仁

【特許出願人】

    【住所又は居所】 大阪府箕面市箕面5-13-53-209

    【氏名又は名称】 関 達治

【特許出願人】

    【住所又は居所】 大阪府吹田市山田西1-28 A18-308

    【氏名又は名称】 藤山 和仁

【代理人】

    【識別番号】 100078282

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 山本 秀策

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 001878

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プールの可否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法であって、  
植物細胞に、非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る酵素の遺伝子および異種糖タンパク質の遺伝子を導入して形質転換植物細胞を得る工程、および  
得られた形質転換植物細胞を培養する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 2】 前記ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質が、コア糖鎖および外部糖鎖を含み、該コア糖鎖が複数のマンノースおよびアセチルグルコサミンから本質的になり、該外部糖鎖が非還元末端ガラクトースを含む末端糖鎖部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記外部糖鎖が直鎖状構造をもつ、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記外部糖鎖が分岐状構造をもつ、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】 前記分岐糖鎖部分が、モノ、バイ、トリ、またはテトラ構造である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記糖タンパク質がフコースまたはキシロースを含まない、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る糖鎖付加機構を備え、該糖鎖付加機構が、コア糖鎖および外部糖鎖を含む糖鎖であって、該コア糖鎖が複数のマンノースおよびアセチルグルコサミンから本質的になり、該外部糖鎖が非還元末端ガラクトースを含む末端糖鎖部分を含む糖鎖、を付加する、植物細胞。

【請求項 8】 請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法によって得られたヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物による異種糖タンパク質の発現に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体内で機能するタンパク質の多くは糖鎖を持つ糖タンパク質である。糖鎖の多様性 (Lain, R. A., Glycobiology, 4, 759-767, 1994) は種々の重要な生理的役割を担っていることが明らかにされている。

【0003】

現在明らかにされている糖鎖の働きは大きく2つに分けることができる。1つは、糖タンパク質の血中からのクリアランス、リソソーム酵素のリソソームへのターゲッティング、糖タンパク質の特定の組織および器官へのターゲッティングにおいて、細胞間接着のリガンドとして、および細菌およびウイルスの受容体として糖鎖自体が直接機能する場合である。例えば、エイズウイルス (HIV) が標的細胞に感染する過程で、糖タンパク質の糖鎖が関与していることが示されている (Rabehi, L. ら、Glycoconj. J., 12, 7-16, 1995)。HIV表面は、エンベロープタンパク質 gp120 で覆われ、gp120の糖鎖が標的細胞のCD4に結合することでHIVウイルスの感染が始まる。糖鎖のもう1つの働きは、糖鎖自体は機能分子ではないが、タンパク質の高次構造の形成、溶解性、プロテアーゼ抵抗性、抗原性の抑制、タンパク質機能の修飾、タンパク質代謝速度の調節および細胞膜における発現量の調節などに間接的に関与する場合である。例えば、神経系に広く分布する神経細胞接着分子の接着性は糖鎖により調節されている (Edelman, G. M., Ann. Rev. Biochem., 54, 135-169, 1985)。

【0004】

真核生物において、糖タンパク質の糖鎖は、小胞体で前駆体型の糖鎖が脂質上で合成されて、糖鎖部分がタンパク質に転移し、いくつかの糖残基が除去され、ゴルジ体に輸送された後、さらに糖残基が除去された後、付加されて伸長される (Narimatsu, H., Microbiol. Immunol.,

38, 489-504, 1994)。このゴルジ体における糖付加は末端部糖鎖合成と呼ばれ、生物種により大きく異なる。糖鎖生合成系は、真核生物の種類によって異なり、その結果糖鎖構造は種特異的であり、糖を付加する糖転移酵素およびゴルジ体の進化を反映している（成松久、細胞工学、15, 802-810, 1996）。

#### 【0005】

アスパラギン結合型（N-結合型）糖鎖に注目すると、動物には、高マンノース型糖鎖、複合型糖鎖およびそのハイブリッド型が存在する。図1にそれらの構造を示す。一方、植物の複合型糖鎖には、動物の糖鎖にはない $\alpha$ 1-3フコースと $\beta$ 1-2キシロースが存在する（Johnson, K. D. および Chrispeels, M. J., Plant Physiol, 84, 1301-1308, 1997、Kimura, Y. ら, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 215-222, 1992）。また、N結合型糖鎖としては植物糖鎖には動物糖鎖に見出されるシアル酸が存在せず、動物糖鎖に一般に存在するガラクトースも、シカモア細胞のラッカーゼの糖鎖に見出されているが（Takahashi, N. および Hotta, T. ら, Biochemistry, 25, 388-395, 1986）、その例は少なく、またその結合型も $\beta$ 1-3結合であり、動物での結合とは異なる。

#### 【0006】

一般に、ヒトエリスロポエチン（EPO）などヒト由来の有用な糖タンパク質は、ヒトに近い糖鎖構造を有する糖タンパク質を生産する動物細胞宿主で生産されている。しかし、動物細胞で生産されたEPOは、本来の糖鎖構造とは異なる糖鎖構造を有し、生体内における活性が低下した（Takeuchi, M. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7819-7822, 1989）。これをうけて、ホルモン、インターフェロンなどのヒト由来の有用タンパク質の糖鎖構造が解析され、工業的生産に応用されている。

#### 【0007】

近年、外来遺伝子を植物に導入する方法として、アグロバクテリウム法（We

ising, K. ら, Annu. Rev. Genet., 22, 421, 1988)、エレクトロポレーション法 (Toriyama, K. ら, Bio/Technology, 6, 1072, 1988)、金粒子法 (Gasser, C. G. および Fraley, R. T., Science, 244, 1293, 1989) などが確立され、アルブミン (Sijmons, P. C. ら, Bio/Technology, 8, 217, 1990)、エンケファリン (Vandekerckhove, J. ら, Bio/Technology, 7, 929, 1989)、およびモノクローナル抗体 (Benvenuto, E. ら, Plant Mol. Biol., 17, 865, 1991 および Hiatt, A. ら, Nature, 342, 76, 1989)、が植物で生産され、そしてB型肝炎ウイルス主要表面抗原 (HBsAg) (Mason, H. S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 11745, 1992)、および分泌型IgA (Hiatt, A. および Ma, J. S. K., FEBS Lett., 307, 71, 1992) を植物細胞中で生産し得ることも記載されている。しかし、ヒト由来の糖タンパク質を植物で発現する場合、植物は、ヒトと異なる糖鎖付加機構を有するため、生産される糖タンパク質の糖鎖は、ヒトで生産される糖鎖とは異なる構造を有し、本来の生理活性を示さず、また抗原となり得ることが指摘されている (Wilson I. B. H. ら, Glycobiol., vol. 8, No. 7, pp651-661, 1998)。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記従来の課題を解決し、ヒト型の糖鎖をもつ有用糖タンパク質を提供することを目的とする。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法に関する。この方法は、植物細胞に、非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る酵素の遺伝子および異種糖タンパク質の遺伝子を導入して形質転

換細胞を得る工程、および得られた形質転換植物細胞を培養する工程を包含する。

【0010】

上記ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質は、コア糖鎖および外部糖鎖を含み、上記コア糖鎖は、複数のマンノースおよびアセチルグルコサミンから本質的になり、上記外部糖鎖は、非還元末端ガラクトースを含む末端糖鎖部分を含み得る。

【0011】

上記外部糖鎖は、直鎖状構造または分岐状構造を有し得る。

【0012】

上記分岐糖鎖部分は、モノ、バイ、トリ、またはテトラ構造であり得る。

【0013】

上記糖タンパク質は、フコースまたはキシロースを含まなくともよい。

【0014】

本発明は、1つの局面で、非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る糖鎖付加機構を備えた植物細胞に関し、この糖鎖付加機構は、コア糖鎖および外部糖鎖を含む糖鎖であって、上記コア糖鎖は、複数のマンノースおよびアセチルグルコサミンから本質的になり、上記外部糖鎖は非還元末端ガラクトースを含む末端糖鎖部分を含む糖鎖を付加する。

【0015】

本発明はまた、上記の方法によって得られたヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質に関する。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

本発明においては、他に特定されない限り、当該分野で公知である、タンパク質の分離および分析法、ならびに免疫学的手法が採用され得る。これらの手法は、市販のキット、抗体、標識物質などを使用して行い得る。

【0018】



本発明の方法は、ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法に関する。本明細書において、「ヒト型糖鎖」とは、N-アセチルグルコサミン残基と結合したガラクトース残基を有する糖鎖をいう。ヒト型糖鎖におけるガラクトース残基は糖鎖の末端であってもよいし、ガラクトース残基のさらに外側にシアル酸残基が結合していてもよい。本発明の糖タンパク質は、ヒト型糖鎖のコア糖鎖部分、分岐糖鎖部分、および末端糖鎖部分からなる1つ以上の部分において、キシロースおよびフコースの少なくとも一方が結合していないことが好ましく、ヒト型糖鎖のいずれの部分においてもキシロースおよびフコースの少なくとも一方が結合していないことがより好ましく、最も好ましくはヒト型糖鎖中にキシロースおよびフコースのいずれも含まないことがさらに好ましい。

## 【0019】

植物細胞とは、任意の植物細胞であり得る。植物細胞は、培養細胞、培養組織、培養器官、または植物体のいずれの形態であってもよい。好ましくは、培養細胞、培養組織、または培養器官であり、より好ましくは培養細胞である。本発明の生産方法に使用され得る植物種は、遺伝子導入を行い得る任意の植物種であり得る。本発明の生産方法に使用され得る植物種の例としては、ナス科、イネ科、アブラナ科、バラ科、マメ科、ウリ科、シソ科、ユリ科、アカザ科、セリ科の植物が挙げられる。

## 【0020】

ナス科の植物の例としては、Nicotiana、Solanum、Datura、Lycopersion、またはPetuniaに属する植物が挙げられ、例えば、タバコ、ナス、ジャガイモ、トマト、トウガラシ、ペチュニアなどを含む。

## 【0021】

イネ科の植物の例としては、Oryza、Hordeum、Secale、Seccharum、Echinochloa、またはZeaに属する植物が挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、モロコシ、トウモロコシなどを含む。

## 【0022】

アブラナ科の植物の例としては、*Raphanus*、*Brassica*、*Arabidopsis*、*Wasabia*、または*Capsella*に属する植物が挙げられ、例えば、大根、アブラナ、シロイヌナズナ、ワサビ、ナズナなどを含む。

## 【0023】

バラ科の植物の例としては、*Orunus*、*Malus*、*Pynus*、*Fragaria*、または*Rosa*に属する植物が挙げられ、例えば、ウメ、モモ、リンゴ、ナシ、オランダイチゴ、バラなどを含む。

## 【0024】

マメ科の植物の例としては、*Glycine*、*Vigna*、*Phaseolus*、*Pisum*、*Vicia*、*Arachis*、*Trifolium*、*Alphalfa*、または*Medicago*に属する植物が挙げられ、例えば、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、エンドウ、ソラマメ、ラッカセイ、クローバ、ウマゴヤシなどを含む。

## 【0025】

ウリ科の植物の例としては、*Luffa*、*Cucurbita*、または*Cucumis*に属する植物が挙げられ、例えば、ヘチマ、カボチャ、キュウリ、メロンなどを含む。

## 【0026】

シソ科の植物の例としては、*Lavandula*、*Mentha*、または*Perilla*に属する植物が挙げられ、例えば、ラベンダー、ハッカ、シソなどを含む。

## 【0027】

ユリ科に属する植物の例としては、*Allium*、*Lilium*、または*Tulipa*に属する植物が挙げられ、例えば、ネギ、ニンニク、ユリ、チューリップなどを含む。

## 【0028】

アカザ科の植物の例としては、*Spinacia*に属する植物が挙げられ、例えば、ホウレンソウを含む。

## 【0029】

セリ科の植物の例としては、*Angelica*、*Daucus*、*Cryptotaenia*、または *Apitum* に属する植物が挙げられ、例えば、シシウド、ニンジン、ミツバ、セロリなどを含む。

## 【0030】

本発明の生産方法に用いられる植物は、好ましくはタバコ、トマト、ジャガイモ、イネ、トウモロコシ、ダイコン、ダイズ、エンドウ、ウマゴヤシ、およびホウレンソウであり、より好ましくは、タバコ、トマト、ジャガイモ、トウモロコシ、およびダイズである。

## 【0031】

「非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る酵素」とは、植物細胞内の糖タンパク質のタンパク質部分の合成後、糖鎖付加の際に生じる非還元末端アセチルグルコサミン残基へガラクトース残基を転移し得る酵素である。このような酵素の例としては、ガラクトシルトランスフェラーゼ、ラクトースシンターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼが挙げられる。このような酵素は、任意の動物種に由来し得るが、哺乳動物に由来することが好ましく、ヒトに由来することがより好ましい。

## 【0032】

「非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る酵素の遺伝子」は、この酵素をコードすることが公知のヌクレオチド配列を用いて任意の動物細胞から単離してもよいし、市販のものを購入してもよいし、これらを植物での発現に適切にように改変して用いてもよい。

## 【0033】

本明細書では、「遺伝子」とは、構造遺伝子部分をいう。遺伝子には、植物での発現に適切にように、プロモーター、オペレーター、およびターミネーターなどの制御配列が連結され得る。

## 【0034】

「異種糖タンパク質」とは、本発明に用いられる植物において本来発現されない糖タンパク質をいう。異種糖タンパク質の例としては、酵素、ホルモン、サイ

トカイン、抗体、ワクチン、レセプター、血清タンパク質などが挙げられる。酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、キナーゼ、グルコセレブロシダーゼ (glucocerebrosidase)、アルファーガラクトシダーゼ、フィターゼ、TPA (tissue-type plasminogen activator)、HMG-CoAレダクターゼ (HMG-CoA reductase) などが挙げられる。ホルモンおよびサイトカインの例としては、エンケファリン、インターフェロンアルファ、GM-CSF、G-CSF、絨毛性性腺刺激ホルモン、インターロイキン-2、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、エリスロポイエチン、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG)、黄体形成ホルモン (LH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、プロラクチン、卵胞刺激ホルモンなどが挙げられる。抗体の例としては、IgG、scFvなどが挙げられる。ワクチンの例としては、B型肝炎表面抗原、ロタウイルス抗原、大腸菌エンテロトキシン、マラリア抗原、狂犬病ウイルス rabies virus のGタンパク質、HIVウイルス糖タンパク質 (例えば、gp120) などが挙げられる。レセプターおよびマトリックスタンパク質の例としては、EGFレセプター、フィブロネクチン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、凝固因子VIIなどなどが挙げられる。血清タンパク質の例としては、アルブミン、補体系タンパク質、プラスミノゲン、コルチコステロイド結合グロブリン (corticosteroid-binding globulin)、スロキシン結合グロブリン (Throxine-binding globulin)、プロテインC (protein C) などが挙げられる。

## 【0035】

「異種糖タンパク質の遺伝子」は、目的の異種糖タンパク質をコードすることが公知のヌクレオチド配列を用いて任意の細胞から単離してもよいし、市販のものを購入してもよいし、これらを植物での発現に適切なように改変して用いてもよい。

## 【0036】

非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い

得る酵素および異種糖タンパク質の遺伝子は、当該分野で公知の方法により、植物細胞へ導入される。これらの遺伝子は、別々に導入してもよいし、同時に導入してもよい。植物細胞への遺伝子の導入方法の例としては、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、金粒子法などが挙げられる。

## 【0037】

遺伝子が導入された植物細胞は、当該分野で公知の方法により、導入された遺伝子の発現が確認され得る。このような確認方法としては、銀染色、ウェスタンブロットティング、ノザンハイブリダイゼーション、酵素活性の検出などが挙げられる。導入された遺伝子を発現する細胞は、形質転換細胞である。

## 【0038】

非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る酵素および異種糖タンパク質を発現する形質転換細胞は、ヒト型の糖鎖を有する異種糖タンパク質を発現する。つまり、このようにして得られた形質転換植物は、ヒト型の糖鎖付加機構を有する。形質転換細胞を培養することにより、ヒト型の糖タンパク質が大量に生産され得る。ヒト型の糖タンパク質は、コア糖鎖および外部糖鎖を含み、このコア糖鎖は、複数のマンノースおよびアセチルグルコサミンから本質的になる。得られる糖タンパク質の外部糖鎖は、非還元末端糖鎖部分を含む。外部糖鎖は、直鎖状構造をもっているも分岐状構造をもっているもよい。分岐糖鎖部分が、モノ、バイ、トリ、またはテトラ構造のいずれかであり得る。形質転換細胞により生産される糖タンパク質は、好ましくは、フコースまたはキシロースを含まない。

## 【0039】

得られた形質転換植物細胞は、培養細胞の状態で維持されてもよいし、特定の組織または器官へと分化させてもよいし、完全な植物体に再生させてもよい。あるいは、完全な植物体から得られる、種子、果実、葉、根、茎、花などの部分であってもよい。

## 【0040】

形質転換植物細胞により生産された、ヒト型の糖鎖をもつ糖タンパク質は、植物細胞から単離または抽出されてもよい。糖タンパク質の単離方法は、当該分野

で公知である。あるいは、本発明の糖タンパク質は、形質転換細胞中に含まれたままの状態に食用に供され得る。本発明の糖タンパク質は、ヒト型の糖鎖付加を有するので、抗原性を有さず、それゆえ、ヒトを含む動物への投与に適している。

## 【0041】

## 【実施例】

1. ヒト $\beta$ 1-4ガラクトース転移酵素遺伝子のクローニング

$\beta$ 1-4ガラクトース転移酵素(hGT)(EC2.4.1.38)は、すでにクローン化されており、400アミノ酸からなる一次構造が明らかにされている(Masri, K. A. ら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 657-663, 1988)。

## 【0042】

## (1) プライマーの作製と鋳型DNA

Masri. らの報告を参考にし、以下のようなプライマーを作製した。

hGT-5Eco: 5' - AAAGAATTTCGCGATGCCAGGCGCGCGTCCCT-3' (配列番号1)

hGT-2Sal: 3' - TCGATCGCAAAACCATGTGCAGCTGATG-5' (配列番号2)

hGT-7Spe: 3' - ACGGGACTCCTCAGGGGCGATGATCATAA-5' (配列番号3)

hGT6Spe: 5' - AAGACTAGTGGGCCCCATGCTGATTGA-3' (配列番号4)

鋳型DNAは、Clontech社から購入したヒトゲノムDNA、ヒト胎盤cDNA、ヒト腎臓cDNAを用いた。

## 【0043】

## (2) hGT遺伝子cDNAのクローニング

(i) ヒトゲノムDNAを鋳型とし、hGT-5EcoとhGT-7Speとをプライマーに用い；および(ii) ヒト胎盤cDNAを鋳型とし、hGT-2SalとhGT6Speとをプライマーに用いた、2つの組み合わせで以下の条

件でPCR反応を行い、hGTをコードする領域を含む0.4 kbおよび0.8 kbの断片を得た。(PCR反応系) 鋳型DNA 1  $\mu$ l、10 $\times$ PCR緩衝液 5  $\mu$ l、dNTPs (200  $\mu$ M) 4  $\mu$ l、プライマー (10 pmol)、Taqポリメラーゼ (宝酒造 (株)) 0.5  $\mu$ l (Tubポリメラーゼの場合は0.2  $\mu$ l) に水を加えて50  $\mu$ lとした。(PCR反応条件) 第1段階: サイクル数1、変性 (94 $^{\circ}$ C) 5分、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 1分、伸長 (72 $^{\circ}$ C) 2分。第2段階: サイクル数30、変性 (94 $^{\circ}$ C) 1分、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 1分、伸長 (72 $^{\circ}$ C) 2分。第3段階: サイクル数1、変性 (94 $^{\circ}$ C) 1分、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 2分、伸長 (72 $^{\circ}$ C) 5分。

## 【0044】

得られた2つの断片を組み合わせてhGT遺伝子cDNAを構築し、pBlue-script IISK+ (SK) にサブクローニングした。pBlue-script IISK+ (SK) は、Stratagene社から購入した。図2に、hGT遺伝子cDNAを含むプラスミドの構築を示す。得られたhGT遺伝子の塩基配列を配列番号5に、そして推定されるアミノ酸配列を配列番号6に示す。

## 【0045】

得られた配列は、Masriら (上述) に開示のhGT配列と比較して以下の点で異なっていた。a) 位置528のAがGに、位置562のCがTに、位置1047のAがGにそれぞれ変わっていたがコードされるアミノ酸に変化はなかった。b) 位置622から630の9塩基が欠失していた。c) 得られた上記の0.4 kbおよび0.8 kbの断片を接続するためにプライマー作製時に位置405のGをAに、位置408のTをAにそれぞれ変換した。なお、hGT遺伝子cDNAには2つの開始コドン (ATG) があるが、本実験では、第2番目の開始コドン (位置37) から翻訳が始まるように設計した。

## 【0046】

## 2. hGT遺伝子のタバコ培養細胞への導入

(1) hGTは大腸菌で活性型として発現することが報告されている (Aoki, D. ら, EMBO J., 9, 3171, 1990、および Nakazawa, K. ら, J. Biochem., 113, 747, 1993)。

93)。

【0047】

hGTをタバコ培養細胞で発現するために、発現用ベクターpGAhGTを図3に示すように構築した。プロモーターとしては、植物細胞内で構成的に発現するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(CaMV 35Sプロモーター)を用いた。選択マーカーにはカナマイシン耐性遺伝子を用いた。pGAhGTをアグロバクテリウムを介してタバコ培養細胞に導入した。

【0048】

アグロバクテリウムの形質転換は、Bevan. ら, のtriparental mating法(Bevan, M., Nucleic Acid Res., 12, 8711, 1984)を用いて行った。pGA系プラスミド(An, G., Methods Enzymol. 153, 292, 1987)をもつ大腸菌*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 株(suE44、 $\Delta$ lacU169、( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)、hsdR17)(Bethesda Research Laboratories Inc.: Focus 8(2)、9(1986))、およびヘルパープラスミドpRK2013(Bevan, M., Nucleic Acid Res., 12, 8711, 1984)をもつ大腸菌*Escherichia coli* HB101を、それぞれ12.5mg/lのテトラサイクリン、50mg/lのカナマイシンを含む2 $\times$ YT培地で37 $^{\circ}$ Cで1晩、アグロバクテリウム*Agrobacterium tumefaciens* EHA101株(Elizabeth, E. H., J. Bacteriol., 168, 1291, 1986)を、50mg/lのカナマイシン、25mg/lのクロラムフェニコールを含む2 $\times$ YT培地で28 $^{\circ}$ Cで2晩培養した。各培養液1.5mlをエッペンドルフチューブにとり集菌した後、LB培地で3回洗浄した。得られた菌体をそれぞれ100 $\mu$ lの2 $\times$ YT培地に懸濁した後、3種類の菌を混合し、2 $\times$ YT寒天培地に塗抹し、28 $^{\circ}$ Cで培養してpGA系プラスミドを大腸菌からアグロバクテリウムに接合伝達させた。2日後、2 $\times$ YT寒天培地上で一面に増殖した菌体の一部を白金耳でかきとり、50mg/lのカナマイシン、12.5mg



／1のテトラサイクリン、25mg／1のクロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に塗布した。28℃で2日間培養した後、単一コロニーを選択した。

#### 【0049】

タバコ培養細胞の形質転換は、An, G., Plant Mol. Bio. Manual, A3, 1.に記載の方法により行った。テトラサイクリン12.5mg／1を含むLB培地で28℃で36時間培養したアグロバクテリウム(pGA系のプラスミドをもつEHA101株)と培養4日目のタバコ培養細胞*Nicotiana tabacum* L. cv. bright yellow 2(理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター、ジーンバンク室植物細胞開発銀行のカタログ番号RPC1より細胞株名BY-2として入手)の懸濁液をそれぞれ100 $\mu$ l、4mlずつシャーレに入れてよく混ぜ、25℃に暗所で静置した。2日後シャーレの中の培養液を遠心管に移して遠心分離(1000rpm、5分)により上澄みを除いた。次に新しい培地を入れて遠心分離し、細胞を150～200mg／1のカナマイシン、250gmg／1のカルベニシリンの入った改変LS寒天培地のプレートに塗抹し、25℃暗黒下で静置した。約2～3週間後にカルス化した細胞を新しいプレートに移植し、増殖しているクローンを選択した。さらに2～3週間後に、カナマイシン、カルベニシリンを加えた改変LS培地30mlに移し、継代培養を行った。約1ヶ月間選択を繰り返した。得られたいくつかの耐性株の中から無作為に6つの耐性株(GT1、4、5、6、8、および9)を選択した。

#### 【0050】

##### (2) 導入されたhGT遺伝子の確認

得られた耐性株についてT-DNA中の、CaMV35Sプロモーター-hGT遺伝子cDNA-NOSターミネーターを含む2.2kbの断片がタバコ培養細胞のゲノムDNA中に組み込まれていることをサザン解析により確認した。上記の各耐性株からゲノムDNAを調製し、EcoRI、HindIIIで消化した後、サザン解析を行った。

#### 【0051】

タバコ培養細胞からの染色体DNAの調製は、渡部の方法(渡部格、「クロー

ニングとシーケンス」、植物バイオテクノロジー実験マニュアル、農村分化社)に従って行った。タバコ培養細胞10mlを液体窒素で凍結し、乳鉢、乳棒を用いて、粉末状になるまで粉碎した。得られた約5gの粉末が融解しないうちに、遠心管(40ml)中で60℃に予熱した5mlの2×CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド(cetyltrimethylammonium bromide))液に入れてゆっくりよく混ぜ、60℃で10分以上、時々混ぜながら保温した。クロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)5mlを加え、エマルジョンができるまでよく混ぜてから、遠心分離(2,800rpm、15分、室温)した。上層を新しい40ml遠心管に移し、クロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)を用いて抽出操作を繰り返した。得られた上層に1/10容量の10%CTABを入れてよく混合した後、遠心分離操作を行った(2,800rpm、15分、室温)。上層を新しい遠心管に移し、1容量の冷イソプロパノールを入れて良く混ぜ、遠心分離(4,500rpm、20分、室温)した。上清液をアスピレータで除いた後、5mlの1M塩化ナトリウムを含むTE緩衝液を入れ、55~60℃で完全に溶解した。これに、5mlの冷イソプロパノールを入れ、DNAが見えたら、チップの先に引っかけてエッペンドルフチューブ(80%冷エタノール入り)に移しリンスした。さらにDNAを70%エタノールでリンスし、乾燥した沈殿を、適当量のTE緩衝液に溶かし、5μlのRNAaseA(10mg/ml)を加え、37℃で1時間反応させた:2×CTAB液の組成;2%CTAB、0.1M Tris-HCl(pH8.0)、1.4M塩化ナトリウム、1%ポリビニルピロリドン(PVP);10%CTAB液の組成;10%CTAB、0.7M塩化ナトリウム。

#### 【0052】

サザン解析は、以下のように行った。

#### 【0053】

(i) DNAの電気泳動およびアルカリ変性:得られた染色体DNA40μgを制限酵素で完全分解した後、標準的な方法を用い、1.5%アガロースゲル電気泳動(50V)を行った。エチジウムブロマイドで染色し、写真撮影した後、400mlの0.25M HCl中で20分間振とうした後、液を捨て、400

mlの変性溶液(1.5M NaCl、0.5M NaOH)にゲルを浸し、45分間ゆっくり振とうした。次いで液を捨て、400mlの中和溶液(1.5M NaCl、0.5M Tris-Cl (pH7.4))を入れて15分間ゆっくり振とうした後液を捨て、再び中和溶液を400ml入れて15分間ゆっくり振とうした。(ii)トランスファー：電気泳動後のDNAを、20×SSCを用いてナイロンメンブレン(Hybond-N Amersham)にトランスファーした。トランスファーは12時間以上行った。プロットしたメンブレンを、室温で、1時間乾燥させた後、5分間UV固定を行った。20×SSCの組成：3M NaCl、0.3Mクエン酸ナトリウム。(iii)DNAプローブの調製：DNAプローブの調製は、Random prime Labeling Kit(宝酒造)を用いて行った。エッペンドルフチューブに次の反応液を調製し、95℃、3分間加熱後、氷中で急冷した；鋳型DNA 25ng、Random Primer 2μl、水を加えて5μlとする。10×緩衝液、dNTPをそれぞれ2.5μl、[α-<sup>32</sup>P]dCTP(1.85MBq、50mCi)を5μl加え、H<sub>2</sub>Oで24μlにフィルアップした。Klenow fragment 1μlを加え、37℃で10分間保温した後、NAP10カラム(Pharmacia社製)で溶出させてDNAを精製した。95℃で3分間加熱した後、氷中で急冷し、ハイブリダイゼーションプローブとした。(iv)ハイブリダイゼーション：0.05mg/ml 0.5%(w/v) SDSを、以下のプレハイブリダイゼーション溶液に加えて、上記(ii)のメンブレンを浸漬し、42℃で2時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。その後、(iii)で調製したDNAプローブを加え、42℃で12時間以上ハイブリダイゼーションを行った：プレハイブリダイゼーション溶液の組成；5×SSC、50mMリン酸ナトリウム、50%(w/v)ホルムアミド、5×デンハルト溶液(100×デンハルト溶液を希釈して使用)、0.1%(w/v) SDS。100×デンハルト溶液の組成：2%(w/v) BSA、2%(w/v) Ficoll 400、2%(w/v) ポリビニルピロリドン(PVP)。(v)オートラジオグラフィー：以下の順で洗浄した後、標準的な方法によりオートラジオグラフィーを行った。2×SSC、0.1% SDS中、65℃で15分間、2回、次いで

0.1×SSC、0.1%SDS中、65℃で15分間、1回。

【0054】

上記で得られた耐性株のそれぞれから調製したゲノムDNAのサザン分析の結果を図4に示す。図4に示されるように、GT1、6、8および9の4株についてhGT遺伝子が組み込まれていることが確認された。

【0055】

3. ガラクトシルトランスフェラーゼ形質転換体の解析

培養5～7日目の形質転換体(GT-1、6、8、および9)および野生型のBY-2細胞の培養液からそれぞれ細胞を回収し、抽出緩衝液(25mM Tris-HCl、pH7.4; 0.25Mスクロース、1mM MgCl<sub>2</sub>、50mMKCl)に懸濁し、そして超音波処理により破壊(200W; Kaijo Denki Co., Japan)またはホモゲナイズした。細胞抽出液とミクロソーム画分を、Schwientek, T.らの方法(Schwientek, T. およびErnst, J. F., Gene 145, 299-303, 1994)に従って調製した。hGTタンパク質の発現は、抗ヒトガラクトシルトランスフェラーゼ(GT)モノクローナル抗体(MAb 8628; 1:5000)(Uejima, T. ら, Cancer Res, 52, 6158-6163, 1992; Uemura, M. ら, Cancer Res., 52, 6153-6157, 1992)(創価大学成松博士より供与)を用いてウェスタンブロッティングにより検出した。次いでブロットを西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(5%スキムミルク中1:1000; EY Laboratories, Inc., CA)とインキュベートし、洗浄し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼ発色反応は、POD免疫染色キット(Wako Chemicals, Osaka)を用いて実施した。

【0056】

植物特異的複合グリカンのイムノブロット分析は、ニンジン細胞壁β-フルクトシダーゼに対して惹起されたポリクローナル抗血清および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG抗体(5%スキムミルク中1:1000; Sigma)を用いて実施した(Lauriere, M. ら, Plant Phys

iol. 90, 1182-1188, 1989)。

【0057】

$\beta$ 1-4ガラクトシルトランスフェラーゼ活性は、基質として、UDP-ガラクトースおよびピリジルアミノ標識 (PA-)  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  ( $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ ) を用いてアッセイした (Morita, N. ら, J. Biochem. 103, 332-335, 1988)。酵素反応液は、1~120  $\mu\text{g}$  のタンパク質、25mM カコジル酸ナトリウム (pH 7.4)、10mM  $\text{MnCl}_2$ 、200  $\mu\text{M}$  UDP-ガラクトース、および100nM  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  を含んでいた。反応産物は、PALPAK Type R および Type N カラム (Takara 社製) を製造業者の推奨する処方に従って用いて HPLC により分析した。PA 標識した標準として用いた  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  および  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  の2つのアイソマーは、TAKARA SHUZO および Honen, Co. から購入した。

【0058】

図5に、形質転換体および野生型由来のタンパク質のイムノブロッティングを示す。図5に示すように、分子量約50kDaのポジティブシグナルが観察された。これは、アミノ酸配列から推定される分子量 (約40kDa) より大きく、腹水から精製された、または酵母で発現されたウシガラクトシルトランスフェラーゼ (Uemura, M. ら, Cancer Res. 52, 6153-6157, 1992; Schwientek, T. ら, J. Biol. Chem. 271 (7), 3398-3405, 1996) とほぼ等しかった。細胞溶解液 (図5、レーン1~4) と比較してミクロソーム画分 (図5、レーン6~8) で観察された強い免疫反応性バンドは、hGTが細胞内に優先的に局在化していたことを示す。野生型細胞には、免疫反応性のバンドは検出されなかった。

【0059】

形質転換体GT6および野生型BY-2のミクロソーム画分のタンパク質を、 $\text{RCA}_{120}$  アガロースカラム (Wako Chemicals, Osaka)

に結合させ、15容量の10mM酢酸アンモニウムpH6.0で洗浄した。次いで0.2Mラクトースで結合したタンパク質を溶出し、SDS-PAGEで分画した後、銀染色(Wako Silver Staining Kit)(図6)またはレクチン染色した(図7)。レクチン染色には、膜ブロットをTTBS緩衝液(10mM Tris-HCl, pH7.4; 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20)中で洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識RCA<sub>120</sub>(Honen Co. 社製)とインキュベートし、そしてPOD免疫染色キット(Wako Chemicals, Osaka)を用いてガラクトシル化されたグリカンを見視化した(図7)。図7に示すように、野生型のBY2細胞ではRCA<sub>120</sub>の結合は観察されなかったが、GT6は、グリカン成分の非還元末端にガラクトースを持つ糖タンパク質を有していた。

#### 【0060】

野生型BY2細胞およびGT6細胞からのタンパク質抽出物およびRCA<sub>120</sub>アフィニティークロマトグラフィーからのGT6の溶出タンパク質を、複合グリカンに特異的なポリクローナル抗血清でプローブした(図8)。用いた抗血清は主に植物糖タンパク質上の $\beta$ 1, 2-キシロース残基に結合する(Lauriere, M. ら, Plant Physiol. 90, 1182-1188, 1989)。図8に示すように、野生型BY2細胞(レーン1)は用いたポリクローナル抗血清と反応するいくつかの糖タンパク質を含んでいた。GT6は抗血清と反応する糖タンパク質の量が減少した(レーン2)。RCA<sub>120</sub>アフィニティークロマトグラフィーから溶出したGT6糖タンパク質は、ポリクローナル抗血清に結合せず、ガラクトシル化されたグリカンは $\beta$ 1, 2-キシロース残基を含んでいないことを示した(レーン3)。

#### 【0061】

4. hGT導入タバコ培養細胞への西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)遺伝子の導入

上記で得られたGT6株に西洋ワサビペルオキシダーゼを導入した。植物ペルオキシダーゼの中では、西洋ワサビペルオキシダーゼ、特に中性アイソザイムCは、いわゆるHRP(EC1.11.1.7.)として、最もよく研究されてい

る。HRPは、基質特異性が広く、安定性に優れることから種々の酵素反応、例えば、ウェスタンブロッティングの2次抗体などの酵素免疫法に利用されている。現在、西洋ワサビペルオキシダーゼアイソザイム遺伝子は多数クローニングされている (Fujiyama, K. ら, Eur. J. Biochem., 173, 681-687, 1988およびFujiyama, K. ら, Gene, 89, 163-169, 1990)。それらのうちprxClaがコードするClaペルオキシダーゼ (ClaPRX) は、N末端側の30アミノ酸、C末端側の15アミノ酸からなるエキストラペプチドを含む353アミノ酸からなるタンパク質として翻訳され、その後プロセッシングをうけて、308アミノ酸からなる成熟型酵素となることが明らかにされた (Fujiyama, K. ら, Eur. J. Biochem., 173, 681-687, 1988)。ClaPRXの分子量は、42,200~44,000であり、そのうち糖鎖が22~27%を占めており、N-結合型糖鎖は8本存在することが知られている (Welinder, K. G., Eur. J. Biochem., 96, 483-502, 1979)。ClaPRX遺伝子の導入は、図9に示すHRP発現用バイナリーベクターpBIHm-HRPを用いて行った。

#### 【0062】

なお、このpBIHm-HRPは、以下のようにして調製した。まず、HRP cDNAを保持する植物用発現ベクター35S-prxCla (Kawaoka A. ら, J. Ferment. Bioeng., 78, 49-53, 1994) から1.9kbpのHindIII-SacI断片を切り出して調製した。このHindIII-SacI断片は、0.8kbpのCaMV35Sプロモーターに続く完全長の1.1kbpのprxCla cDNA断片を含む。1.9kbpのHindIII-SacI断片を、バイナリーベクターであるpBI101HmB (Akama K. ら, Plant Cell Rep. 12, 7-11, 1992) のHindIII-SacI部位に挿入した。HPT遺伝子 (ハイグロマイシン耐性遺伝子) の3'末端側のBamHI部位は破壊してある。

#### 【0063】

GT6株はカナマイシン耐性であるので、選択マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子であるhpt遺伝子(Griz, L. およびDavies, J., Gene, 25, 179-188, 1983)を用いた。HRPによるGT6株の形質転換は、Rempel, D. H. およびNelson, L. M. の方法(Rempel, H. C. およびNelson, L. M., Transgenic Res. 4: 199-207, 1995)に記載の方法により行った。同様に、コントロールのHRP形質転換体を得るために、野生型BY2細胞にHRP形質転換体を導入して、BY2-HRP株を得た。hGTとHRPの二重形質転換体GT6-HRPは、通常の形質転換体と同様の期間で取得することができた。

【0064】

#### 5. 二重形質転換タバコ培養細胞におけるHRPの発現の確認

得られた二重形質転換体GT6-HRP、コントロールのBY2-HRP、野生型(WT)について、以下に示す方法で、HRP活性発現について調べた。表1に示すように、HRP遺伝子導入形質転換体は、野生株に比べて、約5倍のペルオキシダーゼ活性を示した。

【0065】

【表1】

クローン番号	比活性 [U/mg-タンパク質]
WT-HRP-1	10.3
5	11.3
7	12.6
GT-HRP-4	11.1
5	9.35
8	9.47
野生型	2.49

【0066】

野生型にHRP遺伝子を導入して得られたクローンBY2-HRPは、hGTと



HRPの二重形質転換体GT6-HRPと同程度のペルオキシダーゼ活性を示した。

# 【0067】

(ペルオキシダーゼ活性測定)

タバコ培養細胞をSolution Dの入ったエッペンドルフチューブに入れ、ホモジナイザー (Homogenizer S-203、池田理化社製) を用いて粉碎した。遠心分離 (12,000 rpm、20分間、4℃) により上清液を回収し、これを粗酵素液とした。1 mlのSolution A、1 mlのSolution Bおよび2 mlのSolution Cを混合し、25℃で5分間保温した。これにSolution Dで適当に希釈した粗酵素液を加え、25℃で3分間反応させた。0.5 mlの1N HClを加えることにより反応を停止し、480 nmの吸光度を測定した。対照としては、酵素添加前に1N HClを添加した液を用いた：

Solution A； 1 mM o-aminophenol

Solution B； 4 mM  $H_2O_2$

Solution C； 200 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)

Solution D； 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)

次に、このペルオキシダーゼ活性の上昇が、HRPの発現によるものであるか否かを確認するために、等電点電気泳動で分離後、ゲルの活性染色を行った。等電点電気泳動は、BIO-RAD社製のモデル111ミニIEFセルを用いて行った。PAGEゲルサポートフィルムの疎水面をガラスプレートに密着させた後、キャスティングトレイにのせた。調製したゲル用溶液をサポートフィルムとキャスティングトレイの間に流し込んで、蛍光灯の下45分間光重合させた。作製したゲルに試料を塗布し、蒸留水で湿らせた泳動槽にある両グラフアイト電極にゲルが接するように置き、100V 15分、200V 15分、450V 60分の条件で電気泳動を行った。ゲル用溶液 (ゲル1枚分) の組成は以下の通りである：蒸留水2.75 ml、アクリルアミド (25% T、3% C) 1.0 ml、25% グリセロール 1.0 ml、バイオライト (40%、pH 3~10) 0.25 ml、10% 過硫酸アンモニウム 7.5  $\mu$  l、0.1% リボフラビン-5'

ーリン酸ナトリウム25  $\mu$ l、TEMED 1.5  $\mu$ l。

【0068】

ペルオキシダーゼの活性染色は、関根らの方法（関根ら，植物細胞工学、6、71-75、1994）に従って行った。図10に示すように、BY2-HRP株と、GT6-HRP株において、野生株には存在しない顕著なバンドがpI 7.8の位置に検出された。抗HRP抗体を用いたウェスタン解析を行った結果、同じpI 7.8に対応する位置にシグナルが検出され、hGTとHRPの二重形質転換体GT6-HRPにおいてHRPが発現していることが確認された。

【0069】

6. 形質転換細胞GT6細胞中のN-結合型糖鎖の構造解析

（糖鎖構造の解析方法）

形質転換細胞GT6細胞のN-結合型糖鎖構造を、Palacios, N. Q. ら, Biosci. Biotech. Biochem. (印刷中)、1998で述べられているように、逆相HPLCとサイズ分画HPLCを組み合わせ、さらに二次元PA化糖鎖マッピング、エキソグリコシダーゼ消化、イオンプレートンデムマススペクトロメトリー（IS-MS/MS）（Perkin Elmer社製）により解析した。まず、細胞抽出液をアセトンで脱脂後、100℃、12時間ヒドラジン処理し、糖鎖部分を遊離させた。ヒドラジン分解物を、N-アセチル化し、Dowex 50X2およびDowex 1X2（それぞれ、代理店室町化学工業株式会社、The Dow Chemical Co. 社製）により脱塩し、0.1NアンモニアによりSephadex G-25ゲルろ過カラム（1.8×180cm）（Pharmacia社製）を用いて分画した。ピリジルアミノ化は先に述べた通りである。PA化糖鎖を、Jasco 821-FP Intelligent Spectrophotometer付きJasco 880-PU HPLC装置（日本分光社製）により、Cosmosil 5C18-P及びAsahipak NH2P-50をカラムに用いて分離した。溶出位置を、自ら調製したか、あるいは購入した（Wako ChemicalsおよびTAKARA SHUZO）既知の標準品と比較した。

【0070】

N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ (*Diplococcus pneumoniae*, Boehringer Mannheim) あるいはマンノシダーゼ (タチナタマメ, Sigma) を用いたグリコシダーゼ消化は, Kimura, Y. ら, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (2), 215-222, 1992 で述べた方法と同様の条件下で約1 nmol のPA化糖鎖について行った。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*Diplococcus pneumoniae*, Boehringer Mannheim) と *Aspergillus saitoi* 由来の $\alpha$ -1, 2マンノシダーゼ (東北大学吉田孝博士より分与) による消化については, 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中に1 nmol のPA化糖鎖を200 mU  $\beta$ -ガラクトシダーゼあるいは60  $\mu$ g  $\alpha$ -1, 2マンノシダーゼを37°Cで加温した。酵素反応を沸騰させて停止し、消化物の一部をサイズ分画HPLCにより解析した。生じた消化物の分子量はイオンスプレーマススペクトロメトリー (IS-MS/MS) により解析し、そして/あるいはPalacpac, N. Q. ら, *Biosci. Biotech. Biochem.* 印刷中およびKimuraら, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (2), 215-222, 1992 に示されているように標準糖鎖と比較した。

#### 【0071】

IS-MS/MS実験は、Perkin Elmer Sciex API-IIIにより行った。ポジティブモードで、イオンスプレーの電圧を4200Vにて行った。スキanningを0.5 Da毎で行い、 $m/z$ を200から記録した。

#### 【0072】

##### (GT6細胞の糖鎖の解析)

GT6細胞より調製したPA化糖鎖を精製し、逆相HPLCとサイズ分画HPLCを組み合わせて解析した。サイズ分画HPLCのもとで、10~20分の位置のフラクションI (図11) には、N-結合型糖鎖は溶出しておらず、ヒドラジン分解による副産物を含む非吸着部分であることを示唆している。MS/MS解析では、PA-GlcNAcに相当する300という $m/z$ 値を持つフラグメン

トイオンを検出できなかった。同様に、50～60分の位置のフラクションXIも、サイズ分画HPLCで溶出を示すピークを検出できなかったのも、N-結合型糖鎖を含んでいないことがわかった。しかし、サイズ分画HPLC (図11) におけるフラクションIIからXまでの解析から、図12に示すA～Qを含む全部で17のピークを回収・精製した。

#### 【0073】

IS-MS/MS分析は、これらのピークのうち7つのピークがN-結合型糖鎖であることを示した。以下各ピークの分析結果を示す。

#### 【0074】

オリゴ糖-A、-E、-H、-I、-M、-O、-P、及び-Q (図12) の溶出位置及び分子量は、PA化糖鎖標準品と対応せず、MS/MS解析ではPA-GlcNAc及びPA-GlcNAc<sub>2</sub>に相当する300及び503というm/z値を有していたが、N-結合型糖鎖一般的に認められるManGlcNAc<sub>2</sub> (M1) 或いはトリマンノースコア糖鎖Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (M3) に相当するフラグメントイオンを検出できなかった (データ未掲載)。他のピークのオリゴ糖-B、-D及び-Nも、300というm/z値を持つフラグメントイオンを検出できなかったのも、N-結合型ではなかった。そこで残りの7つのN-結合型糖鎖について調べた。

#### 【0075】

ピーク-C (m/z 1637.5 ; モル存在比9.3%)、ピーク-F ([M+2H]<sup>2+</sup> m/z 819.5, [M+H]<sup>+</sup> m/z 1639 ; モル存在比15.9%)、ピーク-G (m/z 1475.5 モル存在比19.5%) の溶出位置と分子量はそれぞれ、高マンノース型糖鎖Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (アイソマーM7A及びM7B)、Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (M6B) であった。タチナタマメα-マンノシダーゼで消化すると、各N-結合型糖鎖は、サイズ分画HPLCによりManGlcNAc (M1) へと分解されていることを示した (データ未掲載)。消化物のIS-MS実験によりm/z値665.5というイオンは、M1の計算値664.66に対応していたことから、これらに対応する個々のPA化糖鎖標準品と構造的に同一であることを示している。

## 【0076】

ピーク-J (6.6%) は、分子量1121.5を有していたが、これは $\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  (M3X) の分子量計算値 $m/z$  1121.05と同じであった。989.5、827.5、665.5、503.3及び300に見られたフラグメントイオンの位置は、 $\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ から逐次Xyl、Man、Man、Man及びGlcNAcがこの順序で遊離したものと矛盾しない。タチナタマメ $\alpha$ -マンノシダーゼで処理すると、非還元末端のマンノース残基を除去でき、2次元マッピングは $\text{Man}_1\text{Xyl}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ の溶出位置と同じであった(データ未掲載)。

## 【0077】

ピーク-K (13.2%) のIS-MS実験の解析結果は、このフラクションが2種のN-結合型糖鎖を含む事を示し、そのひとつは分子量が1314.0 (1.4%) で他方が1354.5 (11.8%) だった。このフラクションをさらに逆相HPLCに供し、精製し、更に解析した。分子量1314.0を有する糖鎖ピーク-K-1は、糖鎖標準品 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  (M5) と2次元マッピング及び $m/z$  測定値が同一だった。さらに、タチナタマメ $\alpha$ -マンノシダーゼで処理すると、その分解産物の溶出位置が2次元マッピングでM1と同じ位置に移動したことから、4つのマンノース残基が除去されたことを示した。

## 【0078】

(GT6細胞中のガラクトースが付加したN-結合型糖鎖)

$m/z$  1354.5を有する糖鎖ピーク-K-2は、 $\text{Gal}_1\text{GlcNAc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  (GalGNM3) の予想される分子量 $m/z$  1354.3とよく一致していた。質量分析の結果から、親分子から派生したと考えられるフラグメントイオンはそれぞれ、 $m/z$  1193.5が $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  989.5が $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  827.5が $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  665が $\text{ManGlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  503が $\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  336が $\text{ManGlcNAc}$ 、 $m/z$  300が $\text{GlcNAc-PA}$ そして $m/z$  204が $\text{GlcNAc}$ であった。推定されるN-結合型糖鎖構造から、GalGNM3の2種のアイソマーが考え

られる(図13)。すなわち、 $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6$  ( $\text{Man}\alpha 3$ )  $\text{Man}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 4\text{GlcNAc-PA}$ 及び $\text{Man}\alpha 6$  ( $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 3$ )  $\text{Man}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 4\text{GlcNAc-PA}$ である。精製したPA化糖鎖は、糖鎖標準品 $\text{Man}\alpha 6$  ( $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 3$ )  $\text{Man}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 4\text{GlcNAc-PA}$ と同一の逆相HPLCの溶出位置であった(図13のB)。

## 【0079】

糖鎖構造をエキソグリコシダーゼで処理し、確認した。*D. pneumoniae*  $\beta$ -ガラクトシダーゼは $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 結合特異的であるが、本酵素による消化物は $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ とサイズ分画HPLCにて同一の位置に溶出した(図14A-II)。また、IS-MS/MS分析から $m/z$  1192.0が得られた。これらの結果は、1つのガラクトース残基が、 $\beta 1-4$ 結合している非還元末端の $\text{GlcNAc}$ から除去されたことを示している。さらにこの産物を、 $\beta 1-2\text{GlcNAc}$ 結合特異的な*Diplococcus pneumoniae*由来のN-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼ(Yamashita, K.ら J. Biochem. 93, 135-147, 1983)で消化すると、その消化物は標準品 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ とサイズ分画HPLCにて同じ位置に溶出した(図14A-III)。続いてタチナタマメ $\alpha$ -マンノシダーゼで処理すると、標準品 $\text{ManGlcNAc}_2\text{-PA}$ とサイズ分画HPLCにて同じ位置に溶出した(図14A-IV)。糖鎖構造を図15のK-2に示す。

## 【0080】

ピーク-L (35.5%)は、質量分析結果から $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ が840、 $[\text{M}+\text{H}]^+$ が1680.0であり、 $\text{Gal}_1\text{GlcNAc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  ( $\text{GalGNM5}$ )の予想される分子量 $m/z$  1678.55とよく一致していた。質量分析の結果から、親分子から派生したと考えられるフラグメントイオンはそれぞれ、 $m/z$  1313.5が $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  1152が $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  989.5が $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  827.5が $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  665が $\text{ManGlc}$

$\text{NAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  503 が  $\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  336 が  $\text{ManGlcNAc}$ 、 $m/z$  300 が  $\text{GlcNAc-PA}$  そして  $m/z$  204 が  $\text{GlcNAc}$  であった。*D. pneumoniae*  $\beta$ -ガラクトシダーゼによる消化物は  $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  とサイズ分画 HPLC にて同一の位置に溶出した (図 14 B-I I)。この結果は、1つのガラクトース残基が、 $\beta$  1-4 結合している非還元末端の  $\text{GlcNAc}$  に結合していたことを示している。ガラクトースが除去されたことを、IS-MS/MS 分析により得られた分子量が  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  が 759、 $[\text{M}+\text{H}]^+$  が 1518.0 であることにより確認した。親シグナル  $m/z$  1518.0 である  $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  から、フラグメントイオン  $m/z$  1314 が  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  1152 が  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  990 が  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  827.5 が  $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  665.5 が  $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  503 が  $\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$ 、 $m/z$  300 が  $\text{GlcNAc-PA}$  とが派生していた。 $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  を *Diplococcus pneumoniae* 由来の N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミニダーゼで消化すると、その消化物は標準品  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  とサイズ分画 HPLC にて同じ位置に溶出した (図 14 B-I I I)。Aspergillus saitoi 由来の  $\alpha$ -1, 2 マンノシダーゼで処理しても溶出位置が移動しなかった (図 14 B-I V)。しかし、続いてタチナタマメ  $\alpha$ -マンノシダーゼで処理すると、標準品  $\text{Man}_1\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$  とサイズ分画 HPLC にて同じ位置に溶出した (図 14 B-V)。このことは、非還元末端に存在する4つのマンノース残基が除去されたことを示している。これらの結果から、PA 化糖鎖は、5つのいずれのマンノース残基も、 $\alpha$  1-3 結合したマンノース残基に  $\alpha$  1-2 結合していないことを示す。以上エキソグリコシダーゼ消化、2次元糖鎖マッピング、IS-MS/MS 分析から導きだされる糖鎖構造は、GalGNM5 で、図 15 の L に示す。

【0081】

#### 7. 二重形質転換体 GT6-HRP 細胞中の HRP の糖鎖の構造解析

GT6-HRP 細胞またはコントロールの BY2-HRP 細胞の 7 日間培養し

た培養液のそれぞれのホモゲナイズ物50gから得た粗細胞溶解液を、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で平衡化したCM Sepharose FFカラム(1×10cm)(Pharmacia社製)にかけた。カラムを洗浄後、溶出したペルオキシダーゼを403nmの吸光度で測定した。プールした画分を限外濾過(分子量カット:10,000、Advantec社製)により濃縮し、50mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で透析し、そして平衡化したベンズヒドロキサミン酸-アガロースアフィニティークラム(1×10cm)(KemEn Tec, Denmark)にかけた。カラムを15倍容量の50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で洗浄した後、同じ緩衝液中に調製した0.5Mのホウ酸で、結合したHRPを溶出した。得られたペルオキシダーゼ活性画分をプールし、透析および濃縮した。

## 【0082】

形質転換細胞GT6-HRP細胞およびBY2-HRP細胞のそれぞれから得た精製HRPを、1×10cmのRCA<sub>120</sub>-アガロースカラムにかけた。カラムを、15倍容量の10mM酢酸アンモニウム(pH6.0)で洗浄した。結合タンパク質を、常法に従って溶出し、アッセイした。

## 【0083】

$\beta$ 1-4結合ガラクトースに特異的であるRCA<sub>120</sub>アフィニティークロマトグラフィーから溶出された精製HRPのレクチン染色では、レクチンRCA<sub>120</sub>が、形質転換細胞GT6-HRPで産生されたHRPのみを結合した。レクチンを競合するガラクトースとブレインキュベートすることによりレクチン結合は劇的に減少したので(図16bIII)、この結合は炭水化物特異的であった。D. pneumoniae  $\beta$ -ガラクトシダーゼで精製HRPを前処理しても、RCA<sub>120</sub>結合を阻害した。これらの結果は、RCAがHRP上のN結合型オリゴ糖鎖の末端 $\beta$ 1-4結合位置にあるガラクトースに特異的に結合したことを示す。BY2-HRP細胞中にRCA結合糖タンパク質がないことは、この細胞がHRPグリカンの非還元末端に $\beta$ 1-4結合ガラクトース残基を転移し得ないことを示す。

## 【0084】



RCA<sub>120</sub>で精製したHRP由来のPA誘導体の逆相HPLC (Jasco 821-FP Intelligent Spectrofluorometer を備えた Jasco 880-PU HPLC装置上、Cosmosil 5C18-PカラムまたはAsahipak NH2Pカラムを用いた)、GT6-HRPより精製されたHRPタンパク質上の糖鎖が単一のピークを示した(図17)。一方、BY2-HRPより精製されたHRP画分からは、結合タンパク質または検出可能なピークは観察されなかった。GT6-HRPから得られたピークは、サイズ分画HPLC上で均一であった。二次元マッピング分析および標準糖鎖との同時クロマトグラフィーは、このオリゴサッカライドがGal<sub>1</sub>GlcNAc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PAと一致することが判明した。この構造の確認は、連続的エクソグリコシダーゼ消化によりなされた。標準糖鎖としては、先に調製された糖鎖(Kimura, Yら、Biosci. Biotech. Biochem. 56(2), 215-222, 1992)または市販(Wako Chemicals, OsakaおよびTAKARA SHUZO)の糖鎖を用いた。

#### 【0085】

PA糖鎖のβ-ガラクトシダーゼ(D. pneumoniae)消化は、標準のGlcNAc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PAの溶出位置と一致し、1つの非還元末端GlcNAcにβ1-4結合した1つのガラクトース残基が除去されたことを示した。D. pneumoniae由来のN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼでのこの消化物のさらなる消化は、Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PAの溶出位置に等しい糖鎖を生じ、1つの非還元末端マンノース残基にβ1-2結合したGlcNAc残基を損失したことを示した。植物におけるN結合型プロセッシング経路に基づけば、除去されたGlcNAc残基は、β1-4マンノース残基に連結したα1-3マンノースにあると考えられる。GlcNAc残基の結合位置を確立するために、Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PA(M5)を、Aspergillus saitoi由来α1-2マンノシダーゼとともにインキュベートした。予想されたように、溶出位置にシフトは見られず、M5が予想された構造Manα1-6(Manα1-3)Manα1-6(Manα1-3)Manβ1

-4 GlcNAc  $\beta$  1-4 GlcNAc を有することが確認された。糖鎖をタチナタマメ  $\alpha$ -マンノシダーゼを用いてさらに切りそろえると、公知の Man<sub>1</sub> GlcNAc<sub>2</sub>-PA の溶出位置になった。従って、この糖鎖構造は、Man  $\alpha$  1-6 (Man  $\alpha$  1-3) Man  $\alpha$  1-6 (Gal  $\beta$  1-4 GlcNAc  $\beta$  1-2 Man  $\alpha$  1-3) Man  $\beta$  1-4 GlcNAc  $\beta$  1-4 GlcNAc (Gal<sub>1</sub> GlcNAc<sub>1</sub> Man<sub>5</sub> GlcNAc<sub>2</sub>) に対応する。以上の結果から、GT6 細胞中に存在する糖鎖構造としては図 15 であり、二重形質転換体 GT6-HRP 細胞由来の HRP タンパク質の有する糖鎖構造は、Man  $\alpha$  1-6 (Man  $\alpha$  1-3) Man  $\alpha$  1-6 (Gal  $\beta$  1-4 GlcNAc  $\beta$  1-2 Man  $\alpha$  1-3) Man  $\beta$  1-4 GlcNAc  $\beta$  1-4 GlcNAc (Gal<sub>1</sub> GlcNAc<sub>1</sub> Man<sub>5</sub> GlcNAc<sub>2</sub>) であることが導き出される。

## 【0086】

同様に、形質転換細胞 GT6-HRP 由来の HRP のガラクトシル化 N-グリカン、植物の N-グリカンに特徴的な  $\beta$  1, 2 キシロース残基と特異的に反応することが示されている抗血清と反応せず、植物の複合型グリカン中の抗原性を引き起こすことが示されている糖残基（キシロース残基）（Garcia-Casado, G. ら, Glycobiology 6 (4) : 471-477, 1996）の 1 つが存在しないことを示した（図 18）。

## 【0087】

## 【発明の効果】

本発明により、ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法；非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る糖鎖付加機構を備え、この糖鎖付加機構が、コア糖鎖および外部糖鎖を含む糖鎖であって、コア糖鎖が複数のマンノースおよびアセチルグルコサミンから本質的になり、外部糖鎖が非還元末端ガラクトースを含む末端糖鎖部分を含む糖鎖、を付加する、植物細胞；およびこの方法によって得られたヒト型の糖鎖をもつ糖タンパク質が提供される。本発明のヒト型の糖鎖をもつ糖タンパク質は、糖付加がヒト型であるために、抗原性を有さない。それゆえ、ヒトを含む動物への投与のために有用である。

【 0 0 8 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Tatsuji, Seki and Kazuhito, Fujiyama

<120> Methods for production of glycoproteins  
having human-type sugar chains

<130> J198020401

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer hGT-5Eco

<400> 1

aaagaattcg cgatgccagg cgcgcgtccc t 31

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer hGT-2Sal

<400> 2

tcgatcgcaa aaccatgtgc agctgatg 28

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer hGT-7Spe

<400> 3

acgggactcc tcaggggcga tgatcataa

29

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer hGT-6Spe

<400> 4

aagactagtg ggcccatgc tgattga

27

<210> 5

<211> 1158

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1155)

<400> 5

atg cca ggc gcg tcc cta cag cgg gcc tgc cgc ctg ctc gtg gcc gtc 48

Met Pro Gly Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val

1 5 10 15

tgc gct ctg cac ctt ggc gtc acc ctc gtt tac tac ctg gct ggc cgc 96

Cys Ala Leu His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg

20 25 30

gac ctg agc cgc ctg ccc caa ctg gtc gga gtc tcc aca ccg ctg cag 144

Asp Leu Ser Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln

35 40 45

ggc ggc tcg aac agt gcc gcc gcc atc ggg cag tcc tcc ggg gag ctc	192
Gly Gly Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu	
50 55 60	
cgg acc gga ggg gcc cgg ccg ccg cct cct cta ggc gcc tcc tcc cag	240
Arg Thr Gly Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln	
65 70 75 80	
ccg cgc ccg ggt ggc gac tcc agc cca gtc gtg gat tct ggc cct ggc	288
Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly	
85 90 95	
ccc gct agc aac ttg acc tcg gtc cca gtg ccc cac acc acc gca ctg	336
Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu	
100 105 110	
tcg ctg ccc gcc tgc cct gag gag tcc ccg cta cta gtg ggc ccc atg	384
Ser Leu Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met	
115 120 125	
ctg att gag ttt aac atg cct gtg gac ctg gag ctc gtg gca aag cag	432
Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln	
130 135 140	
aac cca aat gtg aag atg ggc ggc cgc tat gcc ccc agg gac tgc gtc	480
Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val	
145 150 155 160	
tct cct cac aag gtg gcc atc atc att cca ttc cgc aac cgg cag gag	528
Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu	
165 170 175	
cac ctc aag tac tgg cta tat tat ttg cac cca gtc ctg cag cgc cag	576
His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln	
180 185 190	
cag ctg gac tat ggc atc tat gtt atc aac cag gcg gga gac act ata	624
Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile	

195	200	205	
ttc aat cgt gct aag ctc ctc aat gtt ggc ttt caa gaa gcc ttg aag			672
Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys			
210	215	220	
gac tat gac tac acc tgc ttt gtg ttt agt gac gtg gac ctc att cca			720
Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro			
225	230	235	240
atg aat gac cat aat gcg tac agg tgt ttt tca cag cca cgg cac att			768
Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile			
245	250	255	
tcc gtt gca atg gat aag ttt gga ttc agc cta cct tat gtt cag tat			816
Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr			
260	265	270	
ttt gga ggt gtc tct gct cta agt aaa caa cag ttt cta acc atc aat			864
Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn			
275	280	285	
gga ttt cct aat aat tat tgg ggc tgg gga gga gaa gat gat gac att			912
Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile			
290	295	300	
ttt aac aga tta gtt ttt aga ggc atg tct ata tct cgc cca aat gct			960
Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala			
305	310	315	320
gtg gtc ggg agg tgt cgc atg atc cgc cac tca aga gac aag aaa aat			1008
Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn			
325	330	335	
gaa ccc aat cct cag agg ttt gac cga att gca cac aca aag gag aca			1056
Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr			
340	345	350	
atg ctc tct gat ggt ttg aac tca ctc acc tac cag gtg ctg gat gta			1104

Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val  
 355 360 365  
 cag aga tac cca ttg tat acc caa atc aca gtg gac atc ggg aca ccg 1152  
 Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro  
 370 375 380  
 agc tag 1158  
 Ser  
 385  
 <210> 6  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 Met Pro Gly Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val  
 1 5 10 15  
 Cys Ala Leu His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg  
 20 25 30  
 Asp Leu Ser Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln  
 35 40 45  
 Gly Gly Ser Asn Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu  
 50 55 60  
 Arg Thr Gly Gly Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Pro Gly Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly  
 85 90 95  
 Pro Ala Ser Asn Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu  
 100 105 110  
 Ser Leu Pro Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met  
 115 120 125

Leu Ile Glu Phe Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln  
 130 135 140  
 Asn Pro Asn Val Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val  
 145 150 155 160  
 Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu  
 165 170 175  
 His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln  
 180 185 190  
 Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys  
 210 215 220  
 Asp Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro  
 225 230 235 240  
 Met Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile  
 245 250 255  
 Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn  
 275 280 285  
 Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile  
 290 295 300  
 Phe Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala  
 305 310 315 320  
 Val Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn  
 325 330 335  
 Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr  
 340 345 350  
 Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val



355 360 365  
Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro  
370 375 380  
Ser  
385

【図面の簡単な説明】

## 【图 1】

代表的なN結合型糖鎖の構造を示す模式図である。

【圖 2】

hGTのクローニングの方法の模式図である。

## 【图 3】

hGT発現用ベクター pGAhGTの構築方法の模式図である。

## 【图 4】

形質転換体タバコ培養細胞のゲノムのサザン解析を示す写真である。図4 (A) は、ゲノムDNA (40  $\mu$ g) をEcoRIおよびHindIIIで消化した後に電気泳動を行なった。左側の数字はDNA分子量マーカーの位置を表す。図4 (B) は、各形質転換体に組み込まれた、プロモーター、hGT、ターミネーターを含む2.2 kbの断片の模式図を示す。

## 【图 5】

図5は、形質転換タバコBY2細胞(WT)および野生型タバコBY2細胞(WT)からの免疫反応性タンパク質のウェスタンブロッティングの写真である。タンパク質を変性させ、10% SDS-PAGEで電気泳動し、そしてニトロセルロース膜に電気転写した。レーンの数字は、サンプルがそれぞれ以下のものに由来したことを示す：1 = GT1の細胞抽出物；2 = GT6の細胞抽出物；3 = GT8の細胞抽出物；4 = GT9の細胞抽出物；5 = 野生型の細胞抽出物；6 = GT1のミクロソーム画分；7 = GT6のミクロソーム画分；8 = GT8のミクロソーム画分；9 = GT9のミクロソーム画分；および10 = 野生型のミクロソーム画分。

## 【图 6】

*Ricinus communis* (RCA<sub>120</sub>) アフィニティークロマトグラフィーを用いたガラクトシル化糖タンパク質の検出を示す電気泳動写真である。電気泳動ゲルは、銀染色により可視化した。レーン1および2は野生型BY2細胞からのタンパク質を示し、そしてレーン3および4は、形質転換GT6細胞からのタンパク質を示す。分子量はKDaの単位である。

【図7】

*Ricinus communis* (RCA<sub>120</sub>) アフィニティークロマトグラフィーを用いたガラクトシル化糖タンパク質の検出を示すウェスタンブロッティングの写真である。電気泳動したゲルをニトロセルロース膜上へブロットした後、このブロットをレクチン(RCA<sub>120</sub>)染色して可視化した。レーン1および2は野生型BY2細胞からのタンパク質を示し、そしてレーン3および4は、形質転換GT6細胞からのタンパク質を示す。分子量はKDaの単位である。

【図8】

*Ricinus communis* (RCA<sub>120</sub>) アフィニティークロマトグラフィーを用いたガラクトシル化糖タンパク質を、植物の複合型グリカンに存在するキシロースに特異的な抗血清でプローブしたブロッティングの写真である。レーン1および2は、BY2およびGT6からの総タンパク質抽出物を示し、レーン3は、RCA<sub>120</sub>アフィニティークロマトグラフィー後のGT6からの糖タンパク質を示す。分子量はKDaの単位である。

【図9】

カナマイシン耐性遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子を有するバイナリーベクターであり、HRP cDNAを有するプラスミドpBIHm-HRPの模式図である。

【図10】

トランスジェニック懸濁培養細胞におけるHRPの産生を示す等電点電気泳動およびウェスタンブロッティングの写真である。図10(A)は等電点電気泳動の結果を示し、そして図10(B)はウェスタンブロッティングの結果を示す。略語は以下の通りである：WT=野生型；BY2-HRP 1、5、および7=HRP遺伝子で形質転換したBY2細胞のクローン番号；ならびにGT6-HR

P 4、5、および8=HRP遺伝子で形質転換したGT6細胞のクローン番号。

# 【図11】

0.02% TFA中でアセトニトリルの濃度を0~15%の直線状勾配で60分間かけて増加させ、1.2 ml/分の流速で溶出したPA糖鎖の逆相HPLCパターンを示すグラフである。I~XIは、サイズ分画HPLCにおいて溶出および精製した個々の画分を示す。励起波長および放出波長は、それぞれ、310 nmおよび380 nmであった。

# 【図12】

図11におけるPA鎖のサイズ分画HPLCパターンを示すグラフである。PA糖鎖を、水-アセトニトリル混合物中で水の濃度を30~50%に40分間かけて増加させ、0.8 ml/分の流速で溶出させた。励起波長および放出波長は、それぞれ、310 nmおよび380 nmであった。

# 【図13】

2つの標準品糖鎖AおよびBと比較した、逆相HPLCにおけるピーク-K2の溶出位置を示すグラフである。溶出条件は、図11と同様に0.02% TFA中でアセトニトリルの濃度を0~15%の直線状勾配で60分間かけて増加させ、1.2 ml/分の流速で溶出であった。

# 【図14】

エクソグリコシダーゼ消化後に得られたガラクトシル化PA糖鎖のSF-HPLCプロファイルを示すグラフである。PA糖鎖を、水-アセトニトリル混合物中の水含量を30~50%で25分間かけて増加させ、0.8 ml/分の流速で溶出させた。(A) PA-糖鎖K-2; I. 用いたガラクトシル化PA糖鎖の溶出位置; II. Iのβ-ガラクトシダーゼ消化物; III. IIのN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ消化物; IV. IIIのタチナタマメ α-マンノシダーゼ消化物。(B) PA-糖鎖L; I. 用いたガラクトシル化PA糖鎖の溶出位置; II. Iのβ-ガラクトシダーゼ消化物; III. IIのN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ消化物; IV. IIIのα1-2マンノシダーゼ消化物; V. IIIのタチナタマメ α-マンノシダーゼ消化物。

## 【図15】

形質転換細胞から得られたN結合型グリカンの推定構造を示す図である。括弧内の数字は、モル比を示す。

## 【図16】

糖付加HRPの検出を示す、*Ricinus communis* 120 agglutinin (RCA<sub>120</sub>) アフィニティークロマトグラフィーの写真である。図16 (A) は銀染色、そして図16 (B) はレクチンRCA<sub>120</sub>での染色の結果である。レクチン染色のフィルターを細片に切断し、そして緩衝液単独 (I および II) または過剰なガラクトースを含有する緩衝液 (III) でプレインキュベートしたレクチンRCA<sub>120</sub>でプローブした。(II) では、HRP を、SDS-PAGEの前に*Diplococcus pneumoniae*のβ-ガラクトシダーゼで処理した。レーン1はBY2-HRPからの収集画分；そしてレーン2はGT6-HRPからの収集画分である。左側の数字は、タンパク質の標準品の位置およびサイズ (KDa) を示す。

## 【図17】

RCA<sub>120</sub>アフィニティークロマトグラフィーの後に精製されたHRPからのPA糖鎖の逆相HPLCの結果を示す図である。

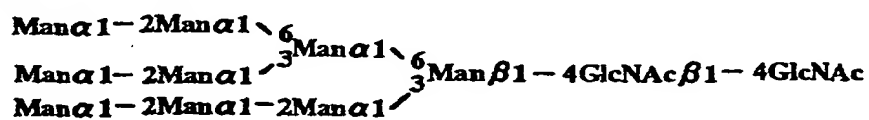
## 【図18】

植物特異的な複合型グリカンの免疫検出を示すウェスタンブロットティングの写真である。精製されたHRPをSDS-PAGEで分画し、ニトロセルロースに転写し、そしてウサギ抗HRP (A) または植物の複合型グリカンに特異的な抗血清 (B) でプローブした。レーン1 = BY2-HRPからの精製HRP；レーン2 = RCA<sub>120</sub>アフィニティークロマトグラフィー後のGT6-HRPからのガラクトシル化HRP。分子のサイズマーカーの位置を、KDaで左に示す。

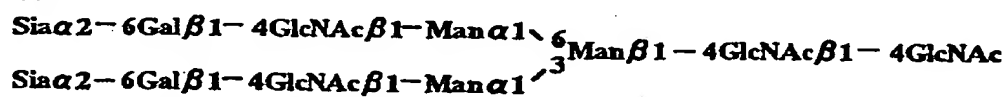
【書類名】 図面

【図 1】

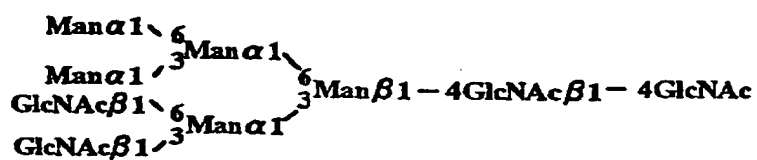
1) 高マンノース型



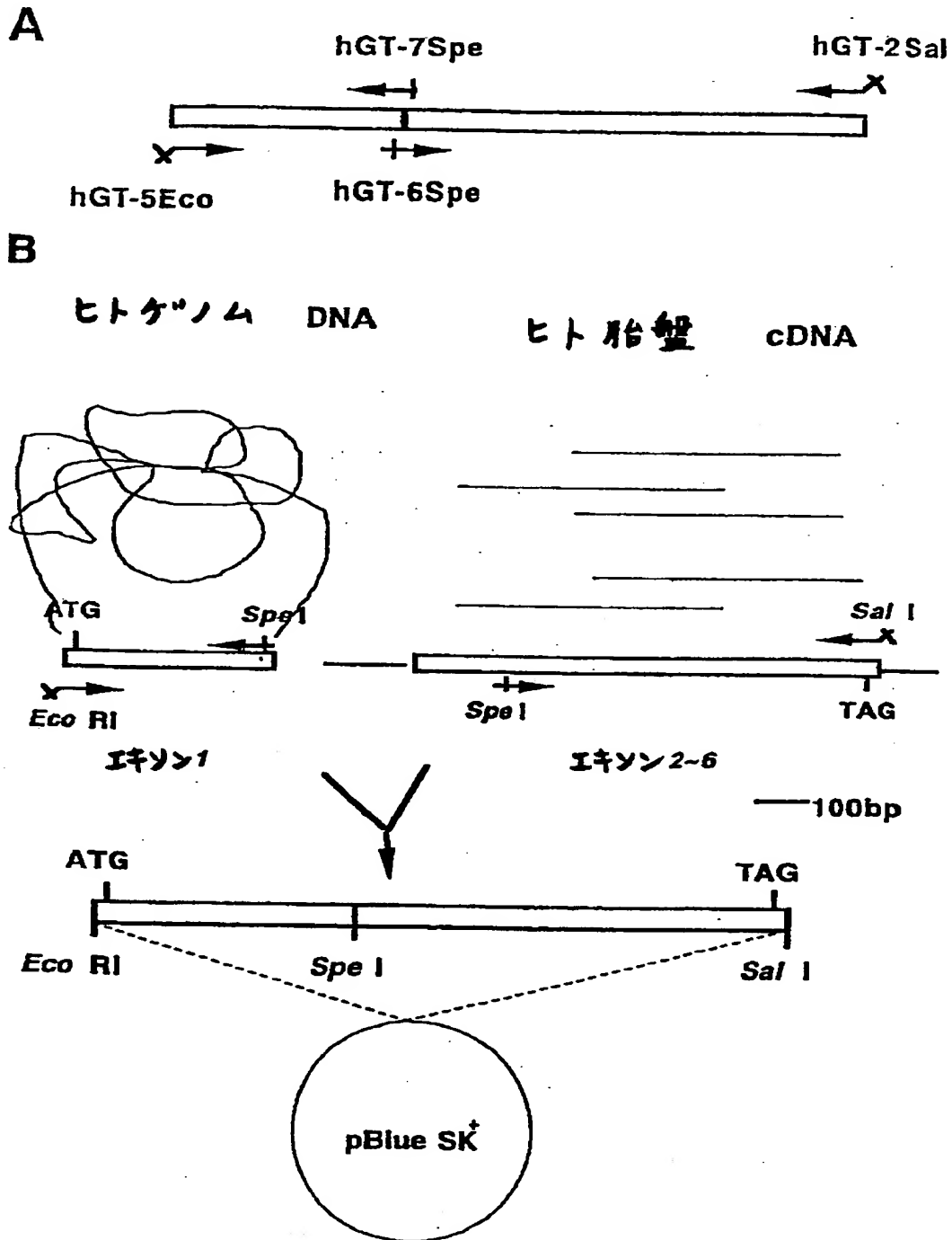
2) 複合型



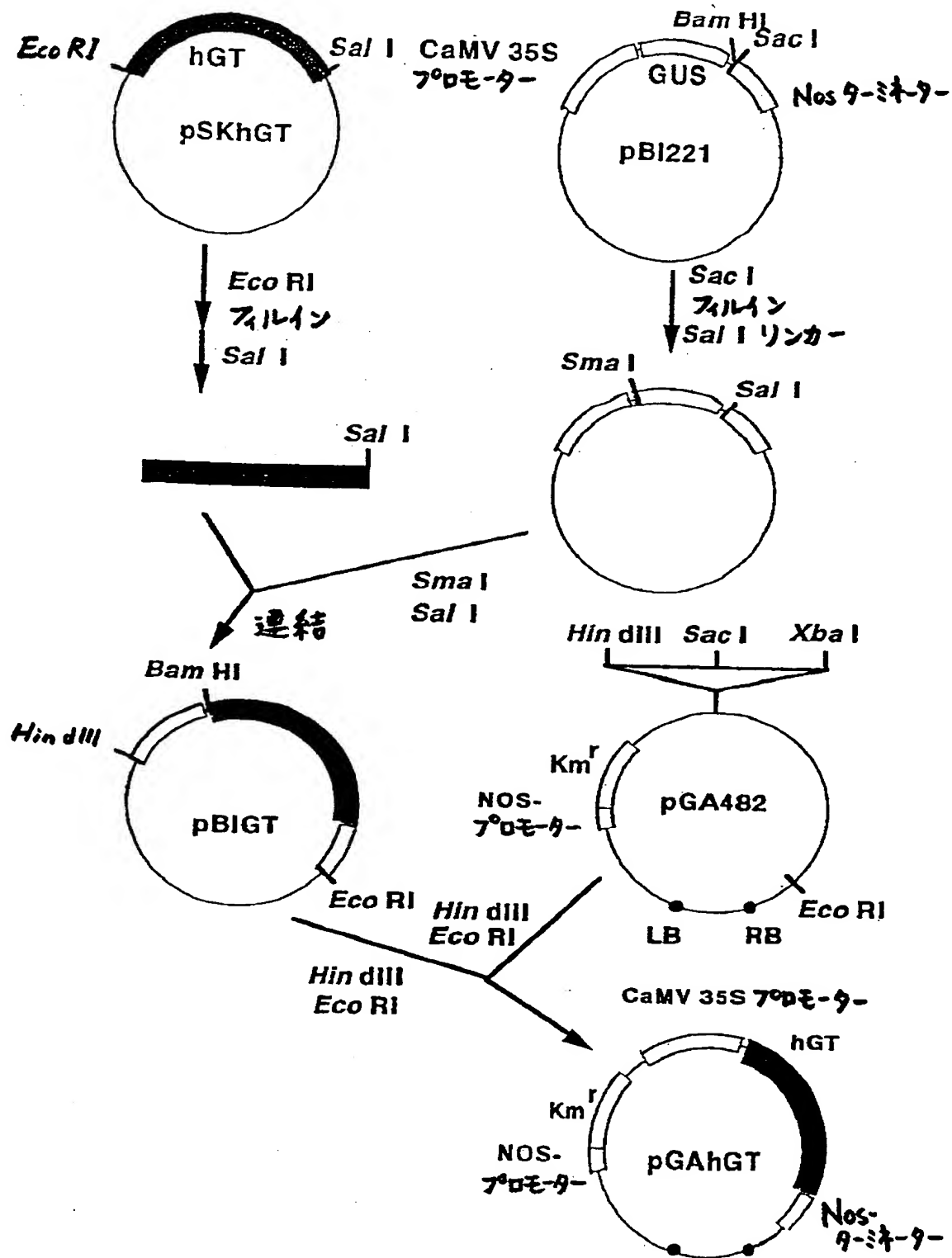
3) ハイブリッド型



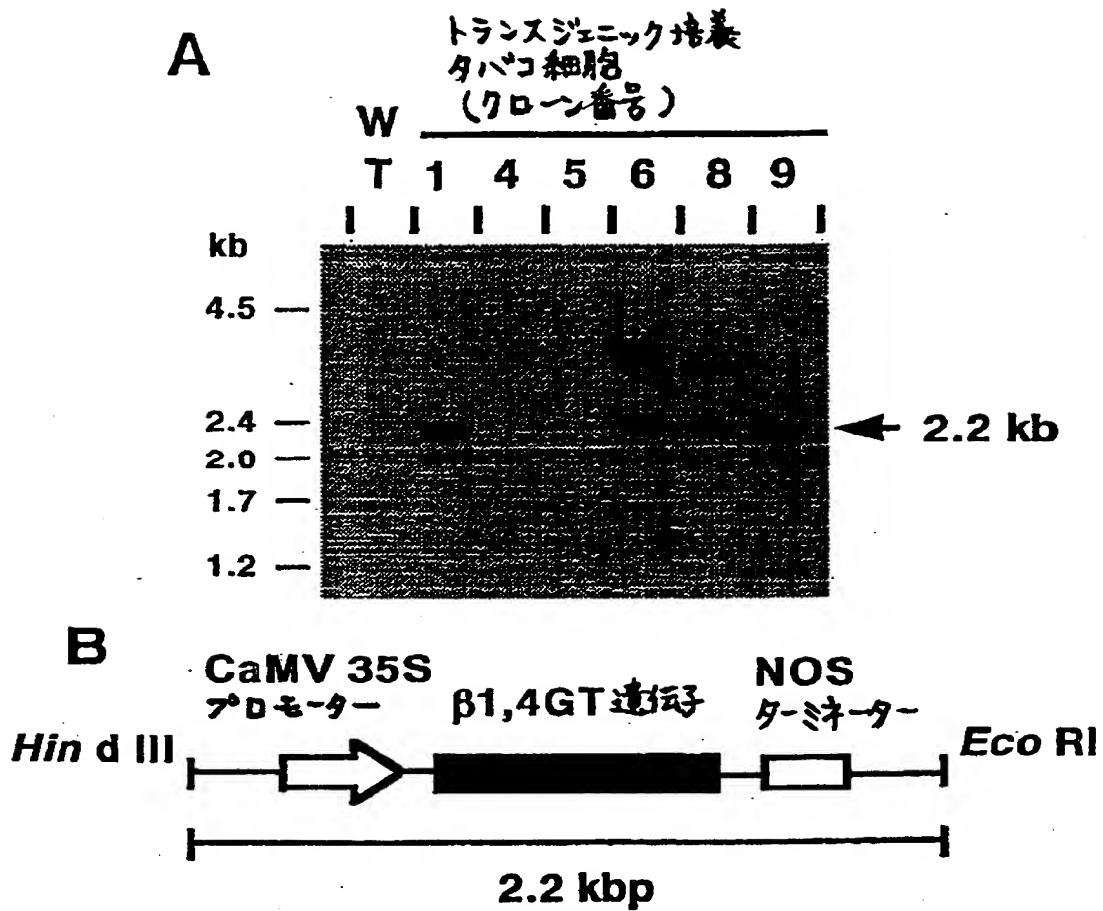
【図2】



【図3】

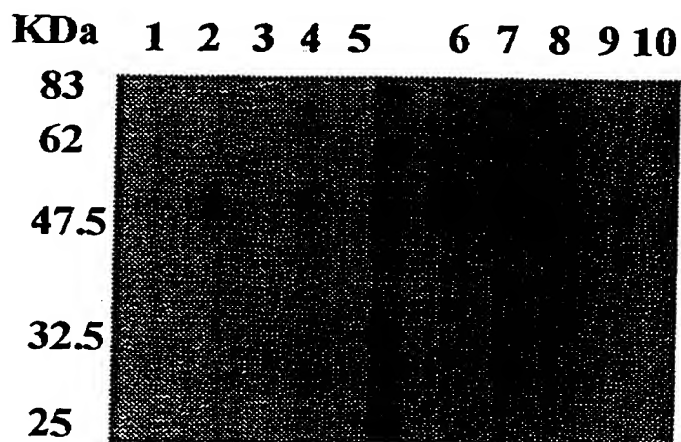


【図4】

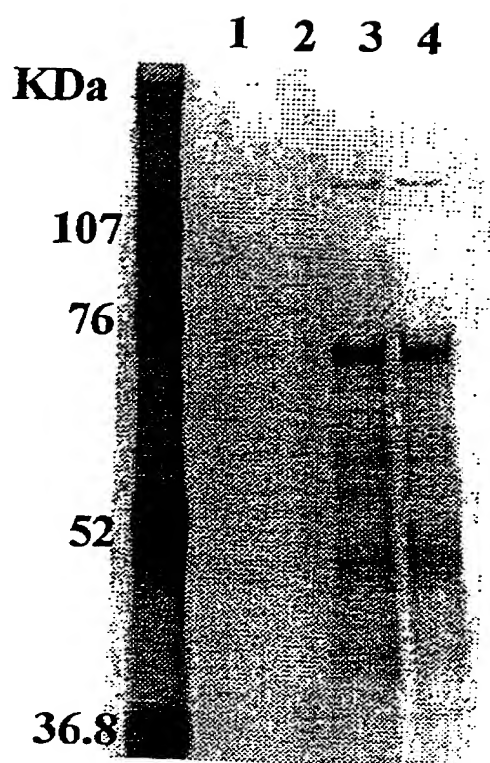




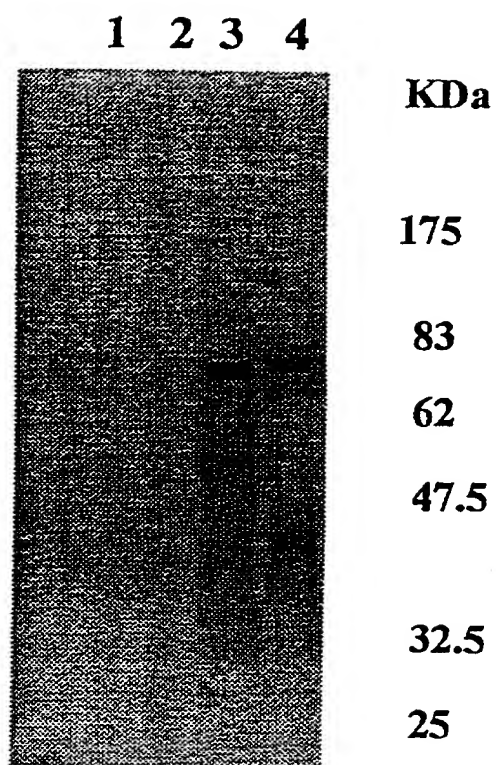
【図 5】



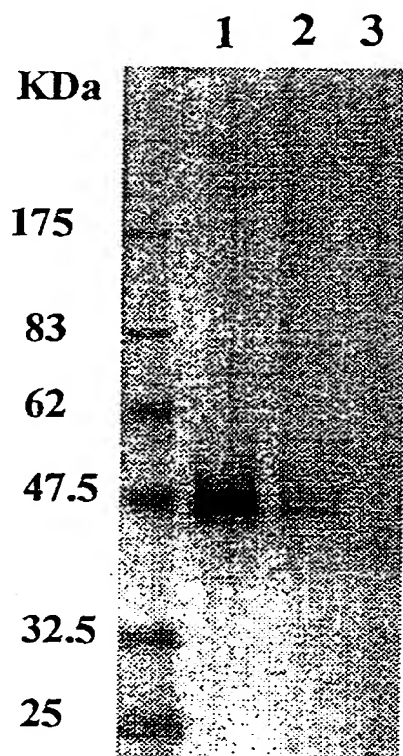
【図 6】



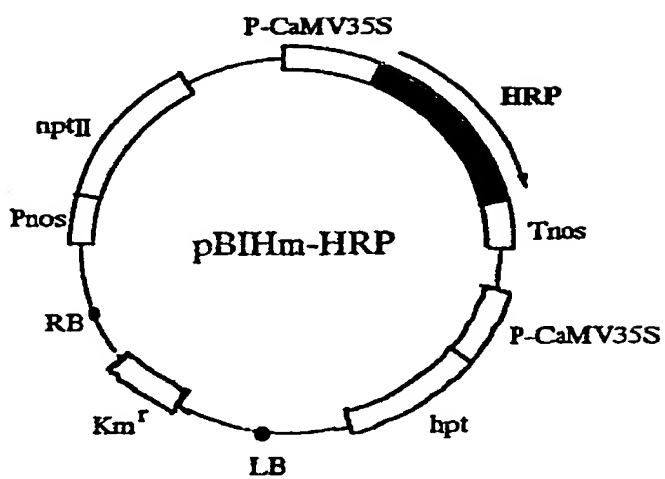
【図 7】



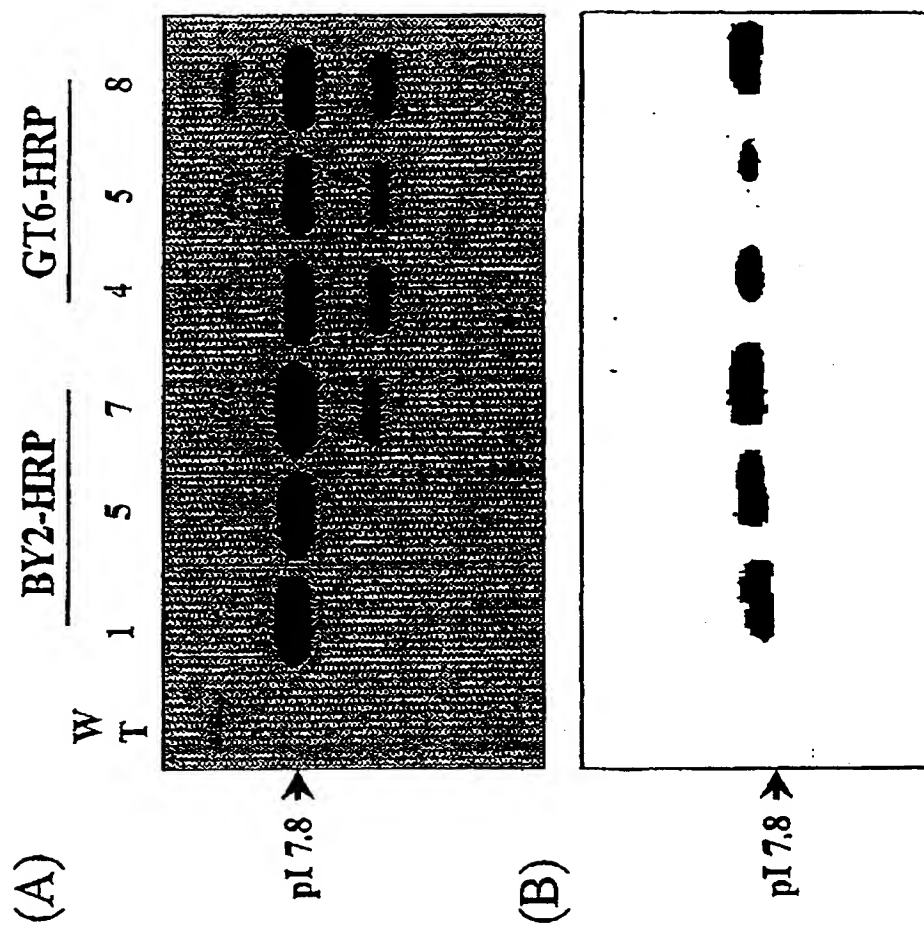
【図 8】



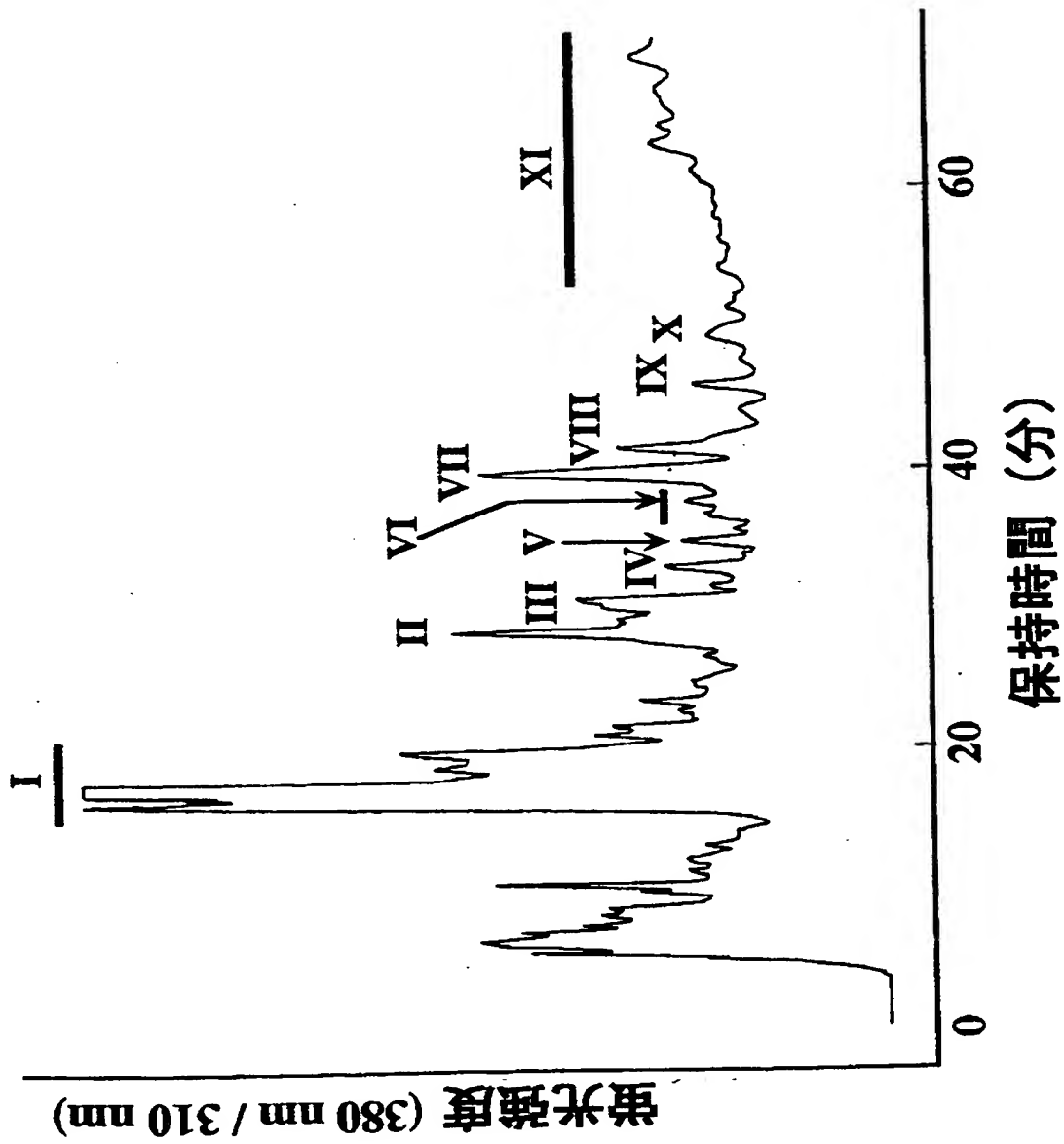
【図 9】



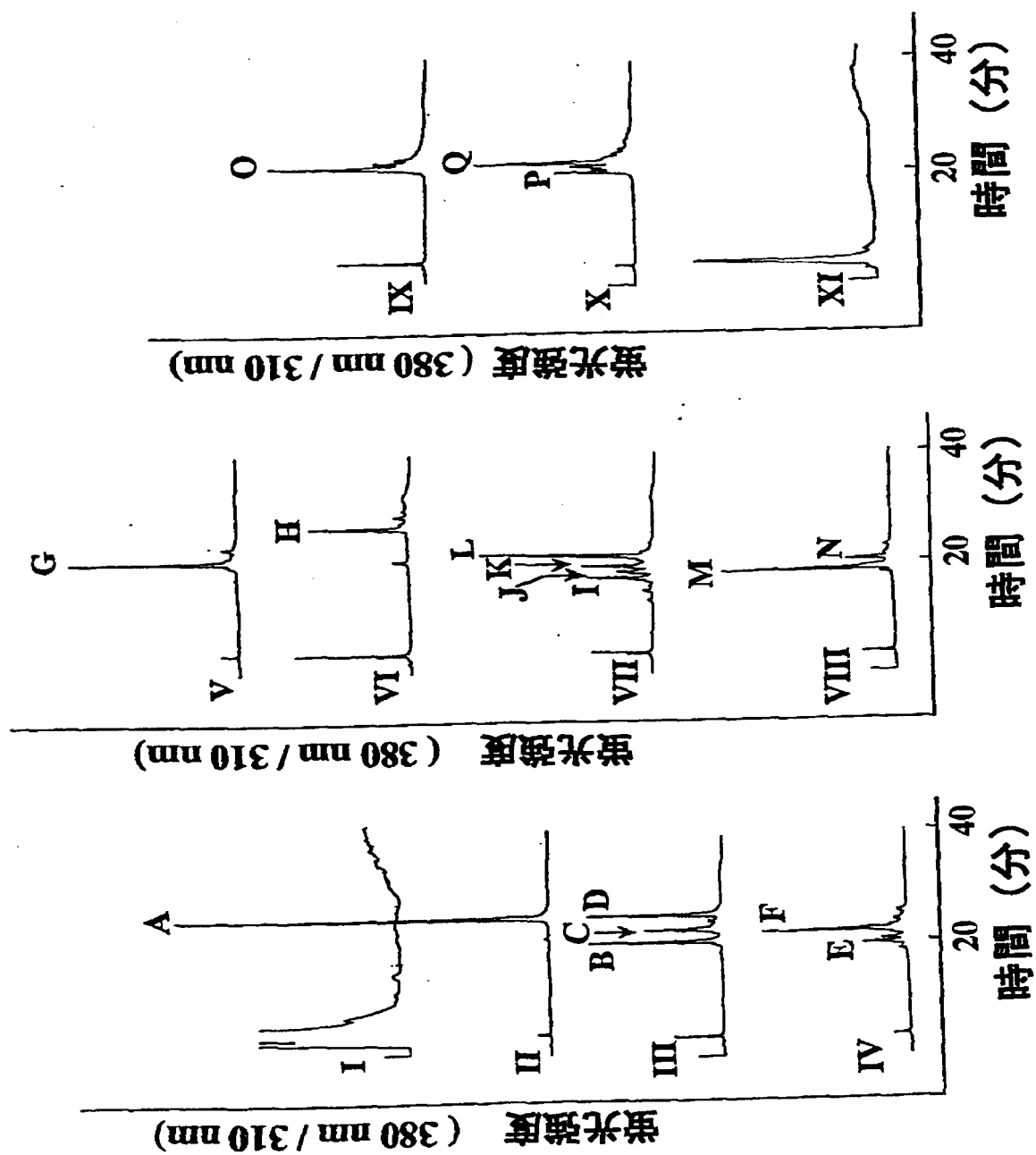
【図 10】



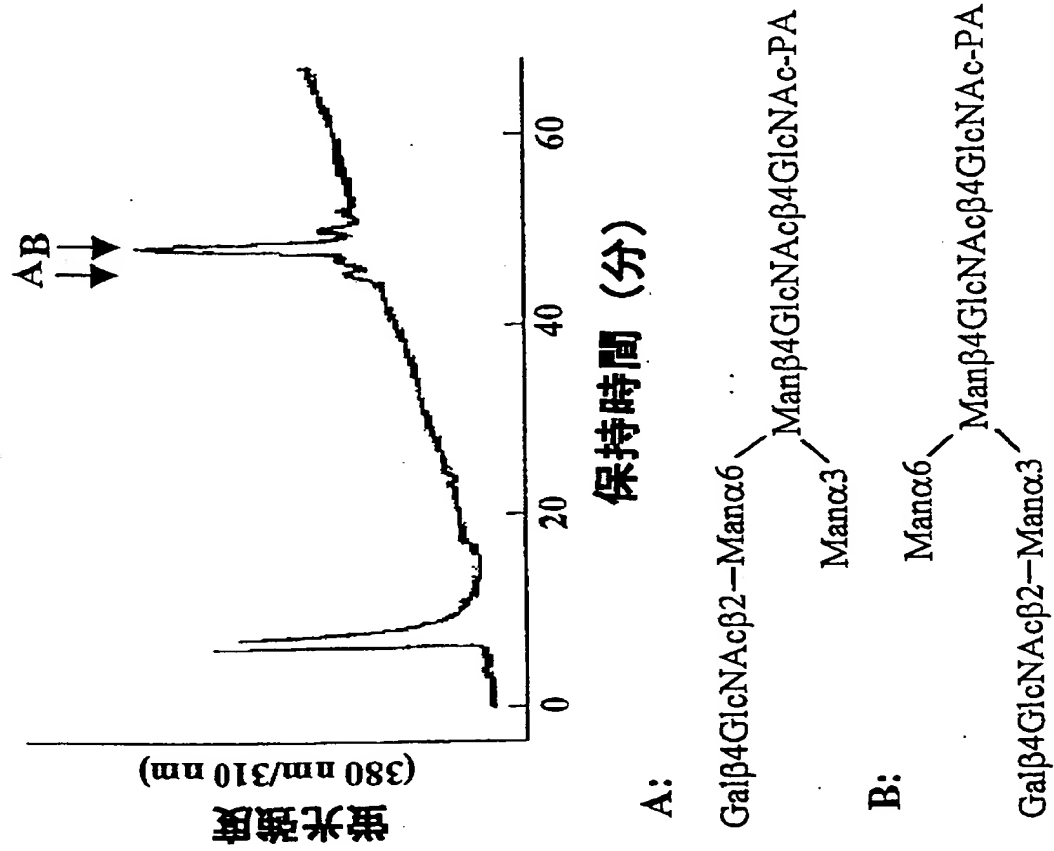
【図 11】



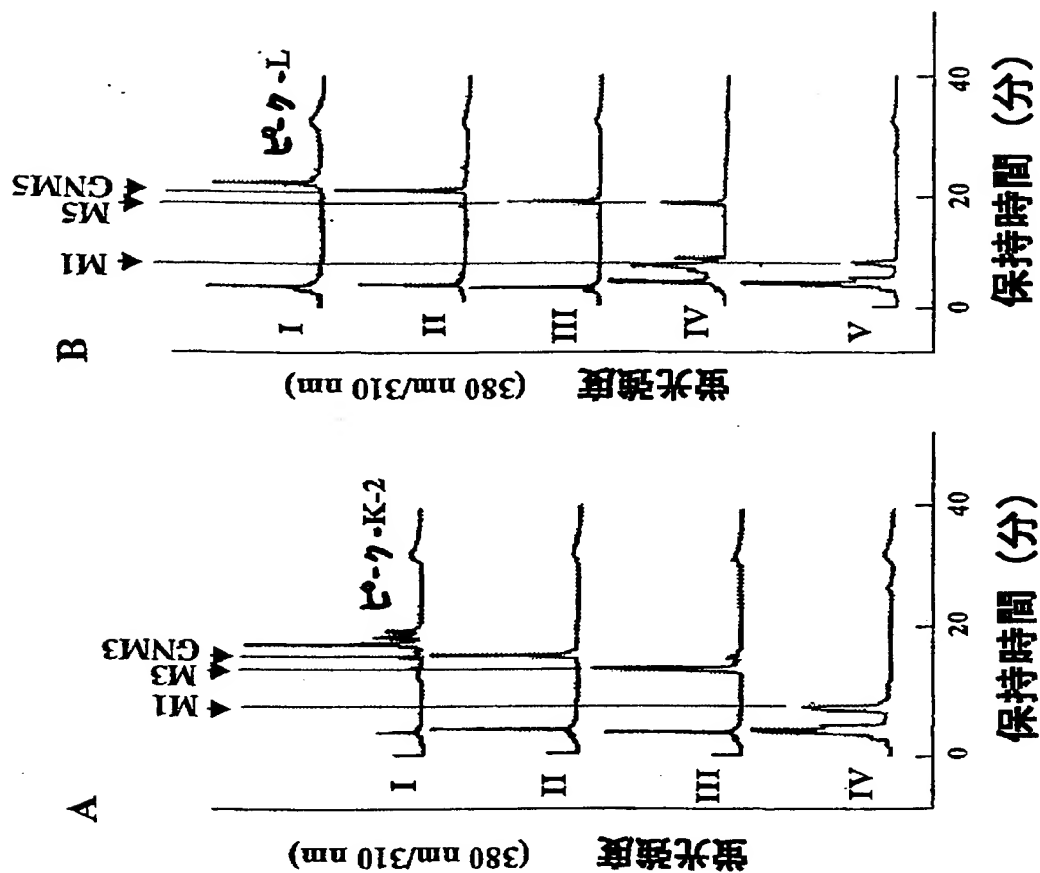
【図 12】



【図 13】

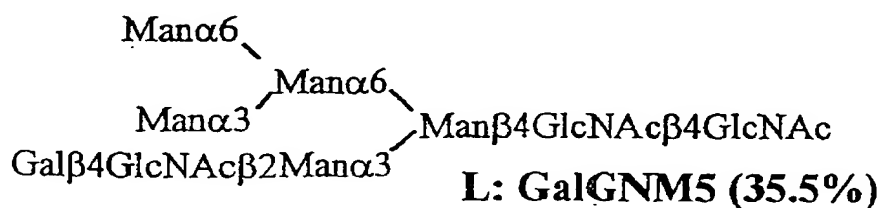
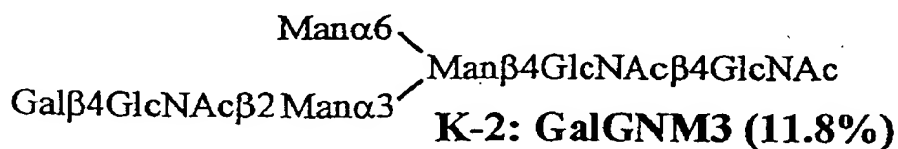
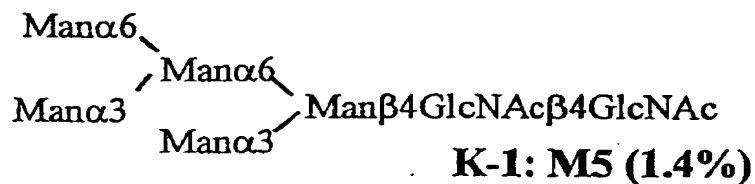
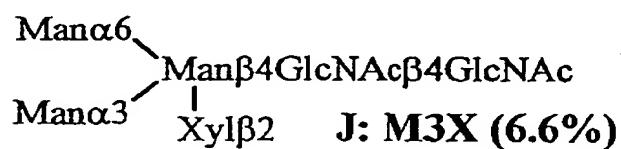
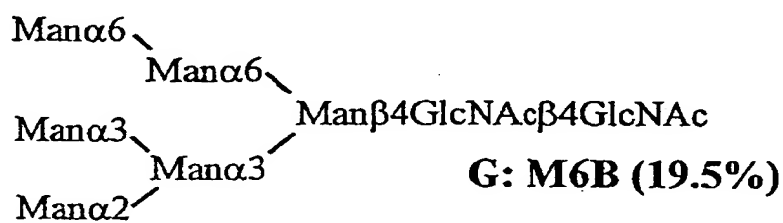
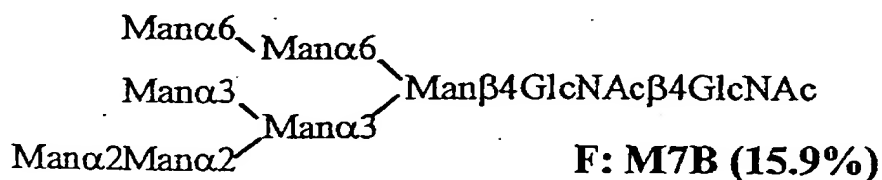
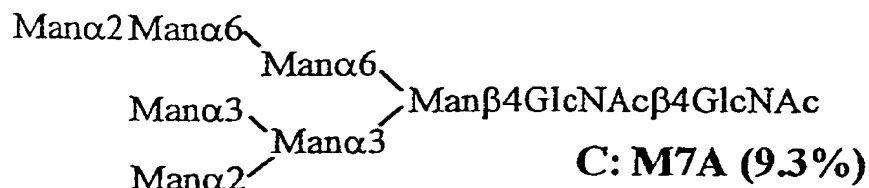


【図 14】

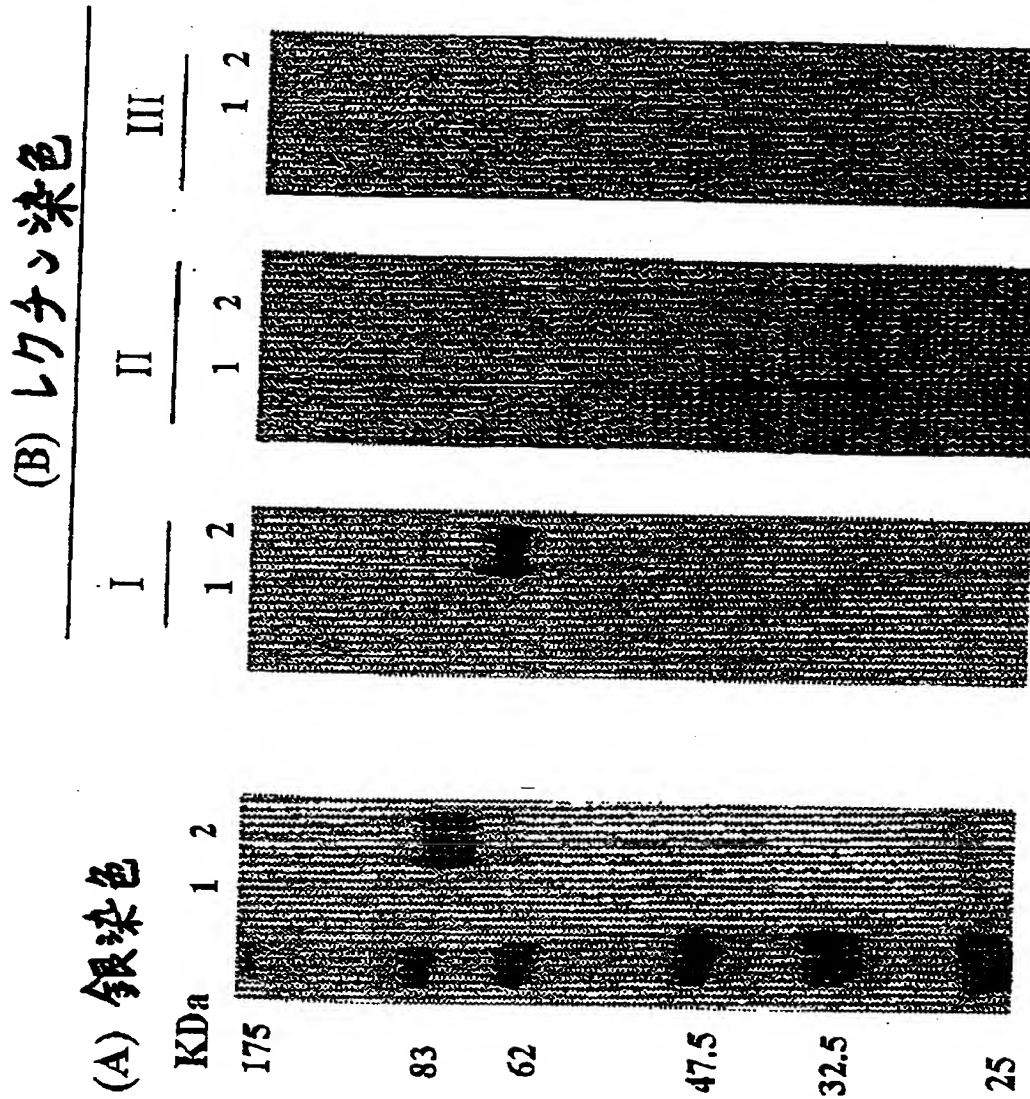




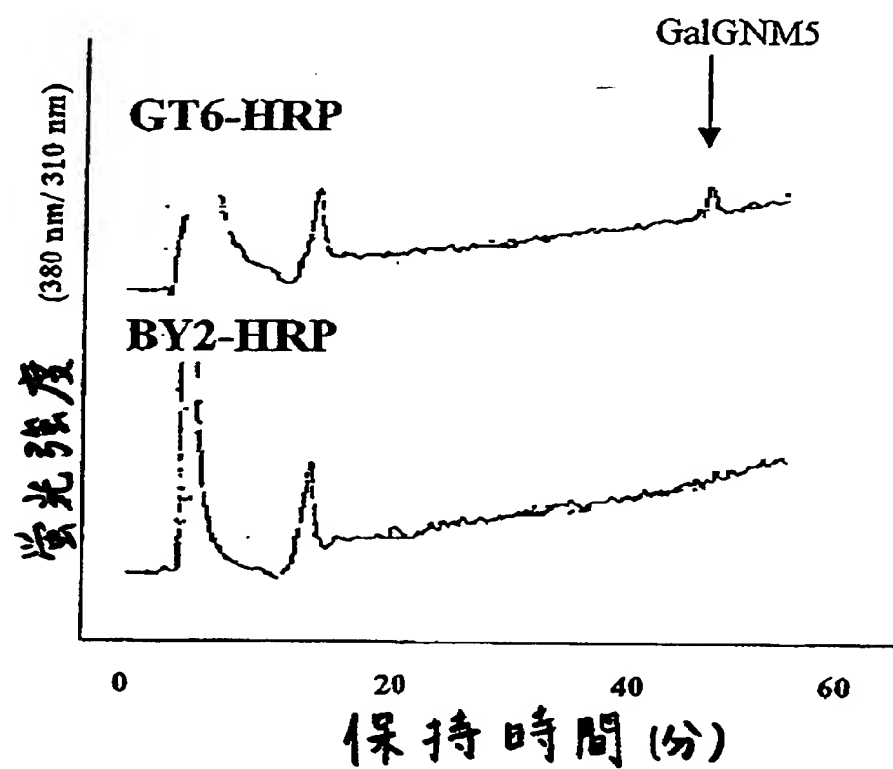
【図 15】



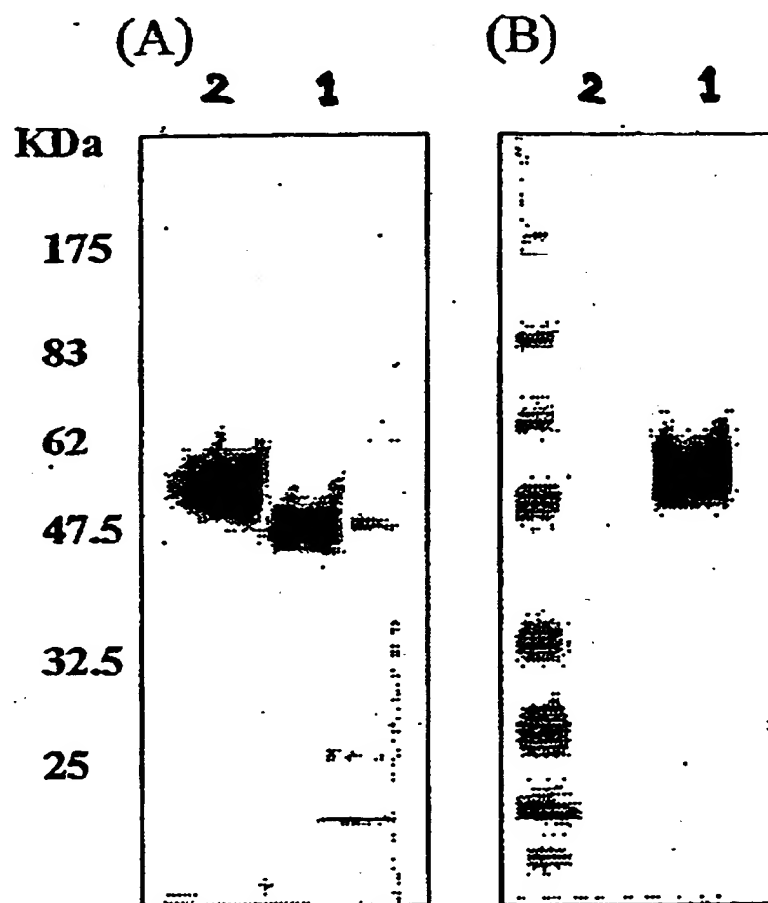
【図 16】



【图 17】



【図 18】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト型の糖鎖をもつ有用糖タンパク質を提供すること。

【解決手段】 ヒト型糖鎖をもつ糖タンパク質の生産方法であって、植物細胞に、非還元末端アセチルグルコサミン残基へのガラクトース残基の転移反応を行い得る酵素の遺伝子および異種糖タンパク質の遺伝子を導入して形質転換植物細胞を得る工程、および得られた形質転換植物細胞を培養する工程を包含する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598169686]

1. 変更年月日 1998年12月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府箕面市箕面5-13-53-209

氏 名 関 達治

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598169697]

1. 変更年月日 1998年12月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府吹田市山田西1-28 A18-308

氏 名 藤山 和仁

